



# LABORATORIJSKA MEDICINA

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

**04**  
SEP 2022



**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  
Damien Gruson  
Nataša Bogavac Stanojević

**Tehnični uredniki:**

Saša Bratož  
Pika Meško Brguljan  
Evgenija Homšak

**Lektoriranje:**

Janja Korošec

**Oblikovanje in tisk:**

Publik Market

**Naklada:**

550 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

**E:** [laboratorijska.medicina@szkklm.si](mailto:laboratorijska.medicina@szkklm.si)

**W:** [www.szkkmlm.si](http://www.szkkmlm.si)

# Uvodnik



Lidija Gobec  
Predsednica SZKKLM

## **Spoštovane kolegice in kolegi!**

Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM) je organizirano kot društvo strokovnjakov s področja klinične kemije in drugih področij laboratorijske medicine v Sloveniji. Med pomembnejše aktivnosti društva spadajo spodbujanje izobraževanja in znanstveno-raziskovalnega dela na področju laboratorijske medicine, prispevek h kakovosti, razvoju in izboljšavam na področju organizacije in strokovnega dela medicinskih laboratorijev ter strokovna uveljavitev in izboljšanje prepoznavnosti medicinske biokemije v slovenskem zdravstvu; slednje je bilo eden od poglobitvenih razlogov ustanovitve združenja pred enainšestdesetimi leti.

V društvo je včlanjenih preko 400 članov, od teh jih ima več kot polovica najmanj univerzitetno izobrazbo ali končan magistrski študij laboratorijske biomedicine, četrtnina pa tudi opravljeno specializacijo iz medicinske biokemije. V zadnjih letih SZKKLM aktivno promovira tudi vključevanje študentov laboratorijske biomedicine. Kot člani združenja imajo študenti prost dostop do vsebin spletne strani in strokovnih srečanj, z njimi pa tudi že sodelujemo v skupnih projektih.

SZKKLM štiti in zastopa interese klinične kemije in laboratorijske medicine v Sloveniji in se povezuje tudi v mednarodne strokovne organizacije. Je aktivni član Evropskega

združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (EFLM – European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) in Mednarodne zveze za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (IFCC – International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine).

SZKKLM od l. 2000 periodično organizira slovenski kongres kliničnih kemikov z mednarodno udeležbo in kongres inženirjev in tehnikov v laboratorijski medicini. V veliko zadovoljstvo in veselje mi je, da se bomo letos po težkih koronskih letih zopet lahko srečali na že 6. kongresu, ki poteka pod pokroviteljstvom EFLM in IFCC.

Izdaja tokratne številke Laboratorijske medicine je usklajena s terminom kongresa, zato si v njej poleg stalne vsebine lahko preberete tudi povzetke prispevkov, ki bodo predstavljeni na kongresu klinične kemije in laboratorijske medicine. Letos smo na kongresu v ospredje postavili naslednje aktualne teme v laboratorijski medicini: umetna inteligenca, tekoče biopsije, diagnostika ledvičnih in ščitničnih obolenj, eden izmed simpozijev je posvečen mladim v laboratorijski medicini. V sklopu kongresnega programa so organizirane tudi delavnice in posterska sekcija. Vabim vas, da na kongresu kar najbolj izkoristite možnost za strokovno izobraževanje, pa seveda tudi za izmenjavo mnenj in prijetno druženje s kolegi.

Prav tako v imenu vodstva SZKKLM vabim vse, ki delujete na področju laboratorijske medicine, da se še aktivneje vključujete v delovanje našega društva. Veseli bomo vaših pobud za aktivno sodelovanje. Vse pa, ki še niste člani SZKKLM, prijazno vabim, da se včlanite. Pred laboratorijsko medicino so številni strokovni izzivi in etične dileme, s katerimi se bomo v skupnem močnem stanovskem združenju lažje soočali.

Zavezanost stroki in ljubezen do poklica, ki ga opravljamo, naj ostaneta vodili našega delovanja v dobro vseh, ki nas potrebujejo.

Mag. Lidija Gobec, spec. med. biokem.  
Predsednica Slovenskega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino

# Kazalo

<b>01</b>	<b>Laboratorijska medicina skozi oči ...</b>	<b>11</b>
	Pika Meško Brguljan Laboratorijska medicina skozi oči predsednice Zbornice laboratorijske medicine Slovenije	12
<b>02</b>	<b>Pregledni strokovni in znanstveni prispevki</b>	<b>15</b>
	Katarina Reberšek, Sandra Šučurovič, Helena Podgornik Laboratorijska hematologija v lovu za majhnimi kloni - določanje merljivega preostanka bolezni (MRD)	16
	Štefka Krivec Novejša spoznanja na področju presnove lipoproteinov	25
	Tamara Rojnik, Mojca Božič Mijovski Prepoznavanje dedno znižane aktivnosti antitrombina - ena metoda za vse?	34
	Borut Božič Vloga proteomike v bolniku prilagojeni laboratorijski medicini	40
<b>03</b>	<b>Izvirni strokovni in znanstveni prispevki</b>	<b>49</b>
	Sebastijan Božič, Milka Ogrin, Polona Likar, Minka Lužovec, Marija Prezelj Ocena merilne negotovosti nekaterih hematoloških parametrov analizatorja Sysmex XN-L 550	50
	Petra Malavašič, Samo Penič, Danijela Furlan Določanje koncentracije popkovničnega bilirubina za napoved razvoja patološke zlatenice pri novorojenčkih	61





## SZKKLM

**04 Povzetki predavanj na strokovnih srečanjih SZKKLM** ..... **69**

<b>Nina Cugmas</b> Mali gosti LDL kot proaterogeni označevalec .....	70
<b>Tadej Furlan</b> Krvna slika: stare težave, nove rešitve .....	75
<b>Martina Fink</b> Laboratorijski odgovor na nove načine zdravljenja motenj strjevanja krvi .....	77
<b>Matjaž Sever</b> Zakaj hočemo svoje CAR-T? .....	80
<b>Irena Preložnik Zupan</b> Prirojene motnje v strjevanju krvi z nagnjenostjo h krvavitvam – nove možnosti zdravljenja, novi izzivi .....	82
<b>Danijela Furlan</b> Pediatrična populacija – najbolj ranljiva skupina svetovnega prebivalstva .....	85
<b>Tadeja Dežman</b> IgE alergije in prikaz kliničnih primerov alergij pri otrocih .....	90
<b>Tatjana Pavlin</b> Koronavirusna bolezen (covid-19) pri otrocih .....	96
<b>Nataša Karas Kuželički</b> Farmakogenomika: pot do bolniku prilagojenega zdravljenja .....	100
<b>Janja Marc</b> Bolnik kot partner v sodobni medicinski obravnavi .....	107
<b>Barbara Ostanek</b> Mikro RNA kot novi biološki označevalci v bolniku prilagojeni laboratorijski medicini .....	111
<b>Greta Štrahl</b> Primeri predanalitskih neskladnosti .....	114

**Izdajo revije so podprli:**

Takeda Pharmaceuticals d.o.o., Siemens Healthcare d.o.o., Abbott Laboratories d.o.o., Pulmodata d.o.o., Fin-Pro d.o.o., Medias International d.o.o., Meditrade d.o.o., Roche farmacevtska družba d.o.o.

# Kazalo

## 05 Povzetki prispevkov na 6. slovenskem kongresu klinične kemije in laboratorijske medicine v Portorožu ..... 119

<b>POVZETEK PLENARNEGA PREDAVANJA</b> ..... 120	<b>IL-8</b> ..... 123
<b>PL-1</b>	Sekcija mladih pri SZKKLM-vizija za prihodnost
Future of Laboratory Medicine with emerging new technologies and artificial intelligence ..... 120	Rok Kogovšek
Sergio Bernardini	<b>IL-9</b>
<b>POVZETKI VABLJENIH PREDAVANJ</b> ..... 120	Pristopi personalizirane medicine za raziskovanje in uporabo novih biomarkerjev ..... 124
<b>IL-1</b>	Vesna Gorenjak
The potential of liquid biopsy in the management of cancer patients ..... 120	<b>IL-10</b>
Evi Lianidou	Prepoznavanje kandidatnih mikroRNA, vpletenih v razvoj in napredovanje nefropatije pri bolnikih s Fabryjevo boleznijo ..... 124
<b>IL-2</b>	Tina Levstek
Plazemske RNA v proučevanju aterogeneze ..... 120	<b>IL-11</b>
Darko Černe	Specifični humoralni in avtoimunski odziv na cepljenje proti COVIDU-19 ..... 125
<b>IL-3</b>	Manca Ogrič, Polona Žigon, Tinka Švec, Katja Lakota, Snežna Sodin-Šemrl, Žiga Rotar, Saša Čučnik,
RNA zunajceličnih veziklov kot biološki označevalci razvoja sladkorne bolezni tipa 1 ..... 121	<b>IL-12</b>
Tine Tesovnik, Jernej Kovač, Maruša Debeljak, Tadej Battelino, Katarina Trebušak Podkrajšek	Laboratorijska medicina: strokovno znanstvena revija Slovenskega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino za vse generacije strokovnjakov ..... 125
<b>IL-4</b>	Katarina Trebušak Podkrajšek
Mitohondrijska DNA kot bioznačevalec v diagnostiki raka prostate ..... 121	<b>IL-13</b>
Irena Prodan Žitnik, Iztok Ditz, Tomaž Smrkolj, Joško Osredkar	How to estimate kidney function in 2022 ..... 126
<b>IL-5</b>	Joris Delanghe
Leadership & Team Development: Success Together ..... 122	<b>IL-14</b>
Pradeep K. Dabla	Jadecare - integrirana oskrba na področju kronične ledvične bolezni ..... 126
<b>IL-6</b>	Jelka Lindič, Karmen Janša, Martina Zorko Kodelja, Miha Arrol, Nena Kopčavar Guček, Radovan Hojs, Dimitrij Klančič, Damjan Kovač, Andrej Škoberne, Nebojša Vasić, Bojan Vujkovic, Marjeta Zupet, Maksimilijan Gorenjak
IFCC TF-YS Networking with millennials, preparing for the future ..... 122	<b>IL-15</b>
Santiago Fares-Taie	Referenčna metoda za določanje hitrosti glomerulne filtracije ..... 126
<b>IL-7</b>	Janez Klavž
Kakšne možnosti / orodja za izobraževanje nudi EFLM mladim v laboratorijski medicini? ..... 123	
Evgenija Homšak	

<b>IL-16</b>	Terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil z uporabo pametne tehnologije.....	127	<b>P-5</b>	Primer nealkoholnega steatohepatitisa pri pediatričnem pacientu z družinsko hipobetalipoproteinemijo kot posledica novo odkrite s premembe v genu <i>APOB</i> .....	131
	Mateja Stopinšek, Polonca Drogenik, Sebastijan Bevc			Neža Molk, Mojca Bitenc, Darja Urlep, Sara Bertok, Urša Šuštar, Katarina Trebušak Podkrajšek, Mojca Žerjav Tanšek, Tadej Battelino, Maruša Debeljak, Urh Grošelj	
<b>IL-17</b>	Thyroid function tests: clinical value, assay evolution and common pitfalls.....	127	<b>P-6</b>	Univants 2021 - measurable better health care performance: Renal Osteodystrophy Monitoring by Monthly PTH Determination in Hemodialysis CKD-MBD Patients.....	132
	Damien Gruson			Sanda Jelisavac Čosić, Draško Pavlović, Boris Kudumija	
<b>IL-18</b>	TSH Reference Values in elderly population (controversial).....	128	<b>P-7</b>	Pomen določanja kalcitonina pri medularnem raku ščitnice.....	132
	Santiago Fares-Taie			Maruša Zupančič, Barbara Možina	
<b>IL-19</b>	Vpliv fizioloških dejavnikov na rezultate laboratorijskih preiskav ščitnice.....	128	<b>P-8</b>	Ocena zmerne fibroze jeter z ELF testom.....	132
	Blaž Krhin			Drago Arzenšek, Lenka Gašperlin, Ivica Avberšek-Lužnik	
<b>IL-20</b>	Vloga laboratorijskega diagnosticiranja pri celostni obravnavi tirolškega bolnika.....	128	<b>P-9</b>	SARS-CoV-2 protitelesa pri skupini prebivalcev Gorenjske.....	133
	Katja Zaletel			Anita Kustec, Branka Svetic	
<b>POVZETKI POSTROV</b>		129	<b>P-10</b>	Overjanje hematološkega analizatorja v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor.....	133
				Petra Uljarevič, Mojca Pušnik, Valerija Domajnko	
<b>P-1</b>	Regulativa preiskovanja bioloških vzorcev za covid-19 v Sloveniji.....	129	<b>P-11</b>	Vpliv genetske variabilnosti v <i>CRP</i> (rs1800947), <i>TNFA</i> (rs1800629) in <i>IL6</i> (rs1800795) na raven vnetnih označevalcev pri bolnikih z zelo povišanimi vrednostmi lipoproteina(a).....	134
	Karmen Jerebic, Borut Božič			Inge Sotlar, Tina Levstek, Nik Podkrajšek, Tamara Rojnik, Miran Šebeštjen, Andreja Rehberger Likozar, Katarina Trebušak Podkrajšek	
<b>P-2</b>	Spremembe v številu kopij izbranih genov pri slovenskih otrocih z B-celično akutno limfoblastno levkemijo.....	129	<b>P-12</b>	Komunikacija znanosti in stroke z javnostjo v času epidemije COVID-19.....	134
	Klementina Črepinšek, Gašper Marinšek, Marko Kavčič, Tomaž Prelog, Lidija Kitanovski, Janez Jazbec, Maruša Debeljak			Jasna Omersel, Tijana Markovič, Martina Gobec, Simona Jurkovič Mlakar, Lucija Ana Vrščaj, Nataša Karas Kuželički	
<b>P-3</b>	Vpliv urejenosti sladkorne bolezni tipa 1 na metilacijo DNA.....	130			
	Barbara Čugalj Kern, Jernej Kovač, Robert Šket, Barbara Jenko Bizjan, Tine Tesovnik, Tadej Battelino, Nataša Bratina				
<b>P-4</b>	Primerjava testnih trakov in refraktometra za določitev relativne gostote v urinu.....	130			
	Aljaž Pirnat, Luka Turnšek, Timotej Puconja, Alenka Trampuš Bakija				

# Kazalo

<b>P-13</b>	Molekularno genetska analiza Beckwith-Wiedemann sindroma.....	135	<b>P-22</b>	Kazalniki kakovosti predanalitične faze; rezultati ankete Delovne skupine za predanalitiko pri SZKKLM.....	139
	<u>Maja Ficko, Sara Bertok, Gregor Nosan, Tinka Hovnik</u>			<u>Timea Tomšič, Eva Fliser, Lidija Gobec, Greta Štrkl, Alenka France Štiglic</u>	
<b>P-14</b>	Primer hude oblike malarije.....	135	<b>P-23</b>	Spremljanje in prepoznavanje virusnih različic SARS-CoV-2.....	140
	<u>Marjana Prah Krumpak, Elizabeta Božnar Alič</u>			<u>Robert Šket, Jera Stritar, Tine Tesovnik, Barbara Jenko Bizjan, Ana Grom, Nina Kulič, Moja Zrimšek, Eva Kozjek, Barbara Slapnik, Špela Kert, Jernej Kovač</u>	
<b>P-15</b>	Avtomatizacija in konsolidacija laboratorijskih procesov na primarni ravni.....	136	<b>P-24</b>	Nacionalni program populacijskega presejanja na družinsko hiperholesterolemijo pri predšolskih otrocih.....	140
	<u>Mateja Šter, Gregor Kurinčič, Darja Pungertnik</u>			<u>Urša Šuštar, Matej Mlinarič, Jernej Kovač, Katarina Sedej, Barbara Jenko Bizjan, Katarina Trebušak Podkrajšek, Tadej Battelino, Urh Grošelj</u>	
<b>P-16</b>	Primer uporabe kazalnika kakovosti.....	136	<b>P-25</b>	Problematika določanja LDL-holesterola pri pacientu z boleznijo jeter.....	141
	<u>Marjana Prah Krumpak, Saša Bratož</u>			<u>Nina Cugmas</u>	
<b>P-17</b>	Prostaglandinski receptor EP4 – nov potencialni biomarker in terapevtska tarča v kronični limfocitni levkemiji.....	137	<b>P-26</b>	Medlaboratorijski transport biološkega materiala z brezpilotnim letalom - dronom.....	141
	<u>Tijana Marković, Alenka Šmid, Helena Podgornik, Damjan Avsec, Irena Mlinarič-Raščan</u>			<u>Jure Belak</u>	
<b>P-18</b>	Določanje multimerne sestave von Willebrandovega faktorja z delno-avtomatizirano gelsko elektroforezo.....	137	<b>P-27</b>	Serum antioxidant enzyme activities in patients with COVID-19 infection with mild symptoms related to age.....	141
	<u>Anja Švigelj, Alenka Trampuš Bakija</u>			<u>Leonard Kurti, Genzane Mucaj Kurti, Iliriana Osmani, Ariana Kelmendi</u>	
<b>P-19</b>	Uporabnost analizatorja Microsemi CRP v laboratoriju terciarne bolnišnice.....	138	<b>P-28</b>	Type 2 Diabetes Mellitus and Heart - a coronary artery stenosis risk association.....	142
	<u>Alenka Trampuš Bakija, Anja Švigelj</u>			<u>Pradeep K. Dabla, Dharmshel Shrivastv, Desh Deepak Sing, Vimal Mehta</u>	
<b>P-20</b>	Pregled laboratorijskih preiskav celiakije na Kliničnem inštitutu za specialno laboratorijsko diagnostiko v letu 2021.....	138			
	<u>Tamara Grgič, Ana Grom, Maruša Debeljak, Tinka Hovnik, Tine Tesovnik</u>				
<b>P-21</b>	Analiza sprememb v številu kopij genov povezanih s hipogonadotropnim hipogonadizmom z metodo MLPA.....	139			
	<u>Špela Zlodej, Maja Ficko, Magdalena Avbelj Stefanija, Katarina Trebušak Podkrajšek, Tinka Hovnik</u>				



## SZKILM

<b>06</b>	<b>Navodila avtorjem prispevkov za revijo Laboratorijska medicina</b>	<b>145</b>
	Navodila avtorjem prispevkov za revijo Laboratorijska medicina	146







**01**

Laboratorijska  
medicina skozi  
oči ...

# Laboratorijska medicina skozi oči predsednice Zbornice laboratorijske medicine Slovenije

**Pika Meško Brguljan**

Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Laboratorij za klinično biokemijo in hematologijo

Dejavnost in kompetence medicinskih laboratorijev so razvidne že iz definicij, ki jih opredeljujeta dva ključna krovna dokumenta za delovanje medicinskih laboratorijev, Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine (Ur. l. RS 64/04, 1/16, 56/19, 131/20 in 152/20 – ZZUOOP) (v nadaljevanju Pravilnik) (1) in mednarodni standard SIST EN ISO 15189 Medicinski laboratoriji – Zahteve za kakovost in kompetentnost (v nadaljevanju SIST EN ISO 15189) (2). Medicinski laboratorij preiskuje vzorce, kot so biološki materiali, pridobljeni iz človeškega telesa, in drugi materiali z namenom pridobiti podatke za postavitev diagnoze, zdravljenje, preprečevanje bolezni ali oceno zdravstvenega stanja pacienta. Pomembno pa je, da medicinski laboratoriji zagotavljajo tudi svetovalne storitve, ki zajemajo vse vidike laboratorijskih preiskav, vključno z interpretacijo rezultatov in svetovanjem o ustreznih nadaljnjih preiskavah.

Zakonodajna osnova za izvajanje dejavnosti medicinskih laboratorijev v Republiki Sloveniji je torej izpolnjevanje zahtev Pravilnika. S tem vsi izvajalci laboratorijskih preiskav, tako laboratoriji (za področja medicinske biokemije, klinične mikrobiologije, patologije, transfuzijske medicine, laboratorijske medicinske genetike, sodne medicine), kot tudi izvajalci laboratorijskega testiranja ob pacientu (POCT) lahko pridobijo dovoljenje za delo Ministrstva za zdravje. Nadalje zahteve za kakovost in kompetentnost medicinskih laboratorijev opredeljuje mednarodni standard za medicinske laboratorije, ki vključuje zahteve o usposobljenosti in kompetentnosti izvajalcev, ter je bil sprejet tudi kot slovenski standard, SIST EN ISO 15189. Akreditiranje medicinskih laboratorijev po mednarodnem standardu SIST EN ISO 15189 poteka pri Slovenski akreditaciji, ki je edina pristojna za akreditiranje v Sloveniji. Akredi-

tacija je mednarodno veljavna. Mednarodni standard, ki podaja zahteve za testiranje ob pacientu (POCT), je SIST EN ISO 22870: Testiranje ob pacientu (POCT) – Zahteve za kakovost in kompetentnost (3). Tudi ta standard podaja zahteve za kompetentnost, kar pomeni, da mora biti osebje, ki izvaja analize, usposobljeno in kompetentno. Standard ISO 22870 se uporablja skupaj s standardom ISO 15189. Zahteve ISO 22870 se uporabljajo, kadar se POCT izvaja v bolnišnici, kliniki ali zdravstveni organizaciji, ki zagotavlja ambulantno oskrbo. Zahteve standarda se ne nanašajo na samotestiranje pacientov, čeprav so nekateri elementi tega standarda lahko uporabni.

Objava Pravilnika v letu 2004 in začetek pregledov izpolnjevanja njegovih zahtev je ključno prispevalo k dvigu kakovosti medicinskih laboratorije v Sloveniji in s tem k varnosti pacientov. Zahteve Pravilnika glede osebja in njihove kompetentnosti, kakovosti se tesno prepletajo z dejavnostjo, ki jo po javnih pooblastilih Ministrstva za zdravje izvaja Zbornica laboratorijske medicine Slovenije (ZLMS). To so tako vodenje registra izvajalcev laboratorijske medicine (4), načrtovanje specializacij in specialističnih izpitov medicinske biokemije (5), kot tudi izvajanje strokovnih nadzorov s svetovanjem pri izvajalcih laboratorijske medicine (6). Izrednega pomena za zagotavljanje kompetentnosti nosilcev dejavnosti laboratorijske medicine so licence specialistov, kar ponovno uvaja letošnja objava odredbe (7), da je za specialiste medicinske biokemije licenca ponovno obvezna. Ministrstvo za zdravje je ZLMS podelilo javno pooblastilo tudi za urejanje tega področja. K urejenosti poklicnih kvalifikacij na področju laboratorijske medicine sodijo tudi programi pripravništev ter strokovni izpiti. Programi pripravništev so bili za celotno področje laboratorijske medicine pripravljene pri ZLMS, usklajeni z »

**Pika Meško Brguljan** je specialistka medicinske biokemije z mednarodno priznanim nazivom evropski specialist laboratorijske medicine in doktoratom znanosti pridobljenim na Univerzi v Ljubljani. V Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik vodi Laboratorij za klinično biokemijo in hematologijo, ki je l. 2017 pridobil akreditacijo SA LM-001 po mednarodnem standardu za medicinske laboratorije SIST EN ISO 15189, aktivna pa je tudi v interdisciplinarnih delovnih skupinah ter svetih Klinike Golnik. Opravlja ali je opravljala vrsto vidnih funkcij in zadolžitev na strokovnem in pedagoškem področju, med drugim v Republiškem strokovnem kolegiju za laboratorijsko medicino – medicinsko biokemijo (predsednica 2008 - 2009, članica: 2002 - ), delovnih telesih Ministrstva za zdravje, kot je Komisija za koordinacijo implementacije Pravilnika (predsednica, 2008 - 2017), in kot predstojnica Katedre za klinično biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Mariboru (2014 - 2020). Aktivno že vrsto let sodeluje pri delovanju Slovenskega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (predsednica 2002 – zač. l. 2008; tajnik 1996 – zač. l. 2002; članica izvršilnega odbora 2008 – 2014, 2021 - ; članica nadzornega odbora 2014 - 2021) in Zbornice laboratorijske medicine Slovenije (članica komisije za vodenja registrov 2008 - 2019; članica odbora za strokovna vprašanja 2010 – 2015; članica komisije za specializacije 2015 - ), kjer je od leta 2019 njena predsednica. Kot predstavnica Slovenije ali članica delovnih skupin deluje ali je delovala tudi pri mednarodnih združenjih IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine), FESCC (Forum of European Societies for Clinical Chemistry), EC4 (European Communities Confederation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) in EFLM (European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine).

vsemi strokovnimi združenji in Republiški strokovni kolegiji, ki delujejo na področju laboratorijske medicine. V letu 2022 so bili tudi objavljeni v Uradnem listu (8).

Kje kot predsednica ZLMS vidim najpomembnejše izzive in naloge pri urejanju in razvoju področja laboratorijske medicine? Med drugim so izzivi vsekakor povezani z uveljavitvijo nove uredbe EU o *in vitro* diagnostičnih me-

dicinskih pripomočkah ((EU) 2017/746) in spremembami, ki jih ta uredba prinaša. S tem, da morajo imeti vsi izvajalci laboratorijskih preiskav za svoje delovanje dovoljenje za delo ministrstva za zdravje smo pomembno dvignili nivo laboratorijske medicine v Sloveniji. Za nadaljnji napredek in mednarodno prepoznavnost kakovosti in kompetentnosti medicinskih laboratorijev pa je ključno, da se v Sloveniji več laboratorijev akreditira po SIST EN ISO 15189. Digitalizacija zdravstva je aktualno področje, kjer je nujna tudi vključenost laboratorijske medicine. S tem je povezan tudi šifrant laboratorijskih preiskav, ki naj bi bil mednarodno uveljavljen. Potrebno je dokončno urediti normative, evidence na področju laboratorijske medicine, financiranje laboratorijskih preiskav, mrežo laboratorijev, področje POCT. To je le nekaj nalog oz. izzivov, ki so pred nami. Ključno vlogo pri njihovi realizaciji pa ima zakonodajalec v tesnem sodelovanju s strokovnjaki laboratorijske medicine. Razvoj laboratorijske medicine je izredno hiter, področja dela se čedalje bolj prepletajo, zato je potrebno za kakovostno, kompetentno delo na področju laboratorijske medicine sodelovanje, povezovanje in zavzetost vseh strokovnjakov ter strokovnih teles na tem področju.

## LITERATURA

1. Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine. Ur. l. RS 64/04, 1/16, 56/19, 131/20 in 152/20 – ZZUOOP.
2. SIST EN ISO 15189: 2013 Medicinski laboratoriji – Zahteve za kakovost in kompetentnost.
3. SIST EN ISO 22870: 2016 Testiranje ob pacientu (POCT) – Zahteve za kakovost in kompetentnost.
4. Pravilnik o registru izvajalcev laboratorijske medicine. Ur. l. RS 113/06, 15/17.
5. Pravilnik o specializaciji iz medicinske biokemije. Ur. l. RS 15/17.
6. Pravilnik o strokovnem nadzoru s svetovanjem v dejavnosti laboratorijske medicine. Ur. l. RS 53/17.
7. Odredba o spremembi Odredbe o seznamu izvajalcev zdravstvenih poklicev, ki morajo biti vpisani v register in imeti veljavno licenco. Ur. l. RS 190/22.
8. Pravilnik o pripravništvu in strokovnih izpitih zdravstvenih delavcev in zdravstvenih sodelavcev na področju zdravstvene dejavnosti. Ur. l. RS 76/22.



02

Pregledni  
strokovni in  
znanstveni  
prispevki

# Laboratorijska hematologija v lovu za majhnimi kloni – določanje merljivega preostanka bolezni (MRD)

## *Laboratory hematology in the hunt for small clones – Determination of measurable residual disease (MRD)*

Katarina Reberšek<sup>1</sup>, Sandra Šučurović<sup>1</sup>, Helena Podgornik<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za hematologijo

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Avtor za korespondenco:

**Doc. dr. Helena Podgornik, spec. med. biokem., spec. lab. med. gen.**

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za hematologijo, Zaloška 7, 1000 Ljubljana

e-pošta: helena.podgornik@kclj.si

### POVZETEK

Merljivi preostanek bolezni (MRD) so levkemične celice, preostale po zdravljenju, ki so biološko zmožne povzročiti ponovitev bolezni v določenem časovnem intervalu. Te celice so tako merilo tumorskega bremena kot tudi neposredni vzrok ponovitve bolezni. V ta namen potrebujemo izjemno občutljive in specifične načine preiskovanja.

Ustrezno občutljivost za določanje MRD izpolnjujejo molekularno genetske metode in večbarvna pretočna citometrija. Med metodami molekularne genetike je najbolj uveljavljen kvantitativni RT-PCR. Pri pretočni citometriji ciljno občutljivost dosežemo tako, da preštejemo zelo veliko število celic. Specifičnost zaznavanja levkemičnega klona je pogojena z uporabo stabilnih označevalcev bolezni, ki jih praviloma prepoznamo ob postavitvi diagnoze in jih nato iščemo ob periodičnem določanju MRD. Ustrezni genet-

ski označevalci so bodisi fuzijski ali mutirani geni, pri določanju s pretočno citometrijo pa specifični imunofenotip levkemičnih celic.

MRD ne glede na uporabljeno metodo podajamo v odstotkih. Za zanesljivost rezultata je bistvenega pomena, da je kakovost vzorca čim boljša. Pri večini krvnih bolezni je občutljivost zaznavanja MRD boljša v kostnem mozgu kot v venski krvi in ključno je, da je način določanja standardiziran. Glede na vrsto bolezni se razlikujejo prazne vrednosti za interpretacijo kliničnega pomena MRD, časovni intervali določanja MRD ter predpisan klinični poseg, temelječ na rezultatih določanja MRD.

**Ključne besede:** merljivi preostanek bolezni, MRD, pretočna citometrija, qPCR

»



## ABSTRACT

Measurable residual disease (MRD) are leukemia cells remaining after treatment that are biologically capable of causing a relapse of disease over a period of time. These cells are both a measure of tumor burden and a direct cause of disease recurrence. Therefore, we need extremely sensitive and specific analytical methods.

Molecular genetic methods and multicolor flow cytometry meet the appropriate sensitivity for MRD determination. Among the molecular genetic methods, quantitative RT-PCR is the most widely used. In flow cytometry, a large number of cells must be counted to achieve the target sensitivity. The specificity of leukemic clone detection is based on the use of stable markers of the disease, which are usually identified at the time of diagnosis and then sought at the periodic determination of MRD. Relevant genetic markers are either fusion or mutated genes

and, when determined by flow cytometry, the specific immunophenotype of leukemic cells.

Regardless of the method used, the MRD is given as a percentage. For the reliability of the result, it is essential that the quality of the sample is as good as possible. In most blood cancers, the sensitivity of MRD detection is better when analysed in the bone marrow than in the venous blood, and it is crucial that the method is standardized. Depending on the type of disease, cut-off values for the interpretation of the clinical significance of MRD, time intervals for determining MRD and clinical intervention based on the results of MRD determination differ.

**Key words:** measurable residual disease, MRD, flow cytometry, qPCR

## UVOD

Merljivi preostanek bolezni (MRD) so levkemične celice, preostale po zaključeni kemo-, imuno-, radioterapiji, ki so biološko zmožne povzročiti ponovitev bolezni v določenem časovnem intervalu (1). Te celice so tako merilo tumorskega bremena kot tudi neposredni vzrok ponovitve bolezni. Periodična preverjanja odziva na zdravljenje dajo informacijo o občutljivosti levkemičnih celic na kemoterapijo in učinkovitosti celotnega zdravljenja ter usmerjajo nadaljnjo izbiro zdravljenja (2). Pri levkemijah so MRD lahko tako ostanki izvornih levkemičnih celic, ki so povzročile bolezen, kot tudi sekundarne levkemične celice, ki so nastale s selekcijo klonov ali transformacijo primarnih levkemičnih celic (2). Zgodovinsko je v hematologiji prepoznavanju ostanka bolezni služil citomorfološki pregled kostnega mozga, ki pa ima zelo majhno občutljivost in specifičnost. V zadnjih dvajsetih letih je bilo zato v razvoj dovolj občutljivih in specifičnih metod za določanje MRD vloženo ogromno napora (3). Sprva uveljavljeni izraz minimalni preostanek bolezni je v zadnjih letih zamenjal ustrežnejši izraz merljivi preostanek bolezni, ki opozarja na omejitve zaznavanja klona z občutljivostjo metode.

Idealni test določanja MRD naj bi natančno kvantificiral levkemične celice. Zahteve, ki jim mora ustrezati metoda določanja MRD, so naslednje (3):

- Velika občutljivost. Občutljivost določanja MRD mora biti najmanj 1 levkemična celica med 10 000 levkociti, kar je izraženo s potenco  $1 \times 10^{-4}$ , v deležu pa 0,01 %.
- Velika specifičnost. Metoda mora zagotavljati zanesljivo ločevanje med levkemičnimi in normalnimi celicami.
- Hitrost. Rezultat mora biti na voljo v razumno kratkem času, ker je od tega odvisno prilagajanje terapije.
- Dovoljšna robustnost, ki omogoča medlaboratorijsko primerjavo.

Merilo ustrezne občutljivosti izpolnjujeta dva načina določanja, in sicer molekularno genetske metode in večbarvna pretočna citometrija (MFC). Ti dve metodi izpolnjujeta tudi zahtevi po hitrosti in robustnosti izvedbe. Specifičnost metode oziroma zanesljivo razlikovanje med levke- »

mičnimi in nelevkemičnimi celicami temelji na ustreznem označevalcu levkemične celice, ki ga praviloma prepoznamo ob diagnozi. Med zdravljenjem ali po njem nato temu označevalcu sledimo. Glede na to so označevalci določanja MRD bodisi povezani s specifičnim imunofenotipom (LAIP – leukemia associated immunophenotype) oziroma z genetskimi posebnostmi levkemične celice.

Ujemanje med rezultati MRD, pridobljenimi s pomočjo MFC, ali molekularno genetskimi metodami je praviloma zelo dobro; pri prazni vrednosti 0,01 % je večje od 90 % (3). Večino razlik gre pripisati približno za desetiški logaritem večji občutljivosti molekularne genetike. Za zdaj imata oba načina svoje prednosti in slabosti, nobeden od njiju pa ni povsem specifičen in občutljiv za napoved ponovitve bolezni (1).

Ko imamo torej ustrezno tehniko in ustrezen označevalec, je za kakovost in uporabnost MRD ključno še (4):

- Standardizacija določanja. Z jasno postavljenimi smernicami se izboljšujeta tudi standardizacija in medlaboratorijska primerljivost.
- Določitev klinične prazne vrednosti, ki je povezana bodisi s preživetjem do napredovanja bolezni bodisi s celokupnim preživetjem. Ključni rezultat določanja MRD je zaznaven ali nezaznaven MRD, ki ga interpretiramo glede na klinično prazno vrednost.
- Časovni intervali določanja. Ti so odvisni tako od posamezne bolezni kot od uporabljene sheme zdravljenja ter tkiva, v katerem se MRD določa.
- Klinični poseg, temelječ na rezultatih določanja MRD. Če MRD ne vpliva na klinične odločitve, tudi njegovo določanje nima smisla.

## DOLOČANJE MRD S PRETOČNO CITOMETRIJO

Že pred klinično uporabo pretočne citometrije je fluorescenčna mikroskopija pokazala imunofenotipske posebnosti levkemičnih celic, vendar ta metoda ni dovolj občutljiva za določanje MRD. Dovoljšno občutljivost omogoča kombinacija številnih fluorokromov na isti celici, kar je omogočila uporaba MFC. Za določanje MRD je priporočena istočasna uporaba vsaj 8 barv (5). Uporaba najustrežnejših LAIP pri MFC je konceptualno različna glede na značilnosti posamezne bolezni. Pri akutni limfoblastni levkemiji T (T-ALL) npr. zadošča že zaznavanje nezrelih celic v kostnem mozgu, ker normalne nezrele timocite sicer najdemo le v priželjcu. Torej ne gre za pravi LAIP, pač pa za specifično najdbo glede na kompartment. Nasprotno pa limfoblaste B najdemo tudi v normalnem kostnem mozgu, ob regeneraciji pa se lahko njihov delež izrazito poveča. Torej potrebujemo pri B-ALL specifičen levkemični odtis oziroma LAIP (3). LAIP je lahko aberantno izražanje določenih označevalcev, ki jih pri normalnih celicah iste vrste sicer ne najdemo, lahko opazimo asinhronizem, pri katerem najdemo antigene, značilne za zrele celice na nezrelih levkemičnih celicah, lahko pa gre tudi za prekomerno ali znižano izražanje ali celo izgubo antigenov, ki so normalno izraženi na izbrani celični liniji. Čim bolj imunofenotip odstopa od normalnega, tem bolj specifično je zaznavanje MRD. Zato so v pretočni citometriji dodajani vedno novi označevalci, ki omogočijo natančnejšo opredelitev LAIP. Diagnostični vzorec je pri tem izjemne-

ga pomena, ker je sicer kasnejše zaznavanje MRD zelo nezanesljivo. Pri otroških ALL ima LAIP npr. kar 98 % vseh bolnikov, kar omogoča dovolj občutljivo sledenje MRD pri domala vseh bolnikih. Prav tako ga ima že izhodiščno limfocit pri kronični limfocitni levkemiji (KLL), pri akutni mieloblastni levkemiji (AML) pa le del bolnikov.

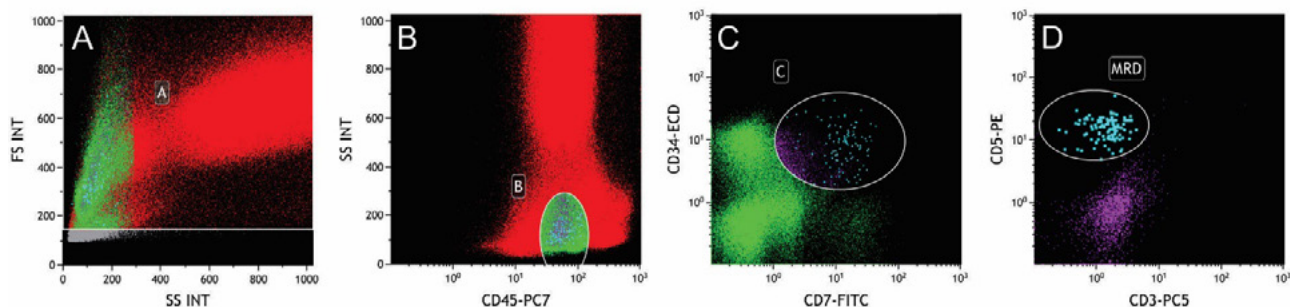
V vsakem izvidu podamo število vseh analiziranih celic in/ali število CD45+ celic (levkocitov), spodnjo mejo zaznave (LOD) in spodnjo mejo kvantifikacije (LOQ). S pretočno citometrijo lahko zaznamo klon, ko populacijo z določenim imunofenotipom sestavlja najmanj 20 celic, kvantificiramo jih lahko, ko je v zaznanem klonu najmanj 50 celic. Kvantitativni rezultat MRD (%) izdamo izključno nad mejo kvantifikacije (LOQ) in je razmerje med številom celic klona ter številom vseh analiziranih celic oziroma levkocitov (CD45 pozitivne celice) pomnoženo s 100. LOD, LOQ ter interpretacija rezultata so tako neposredno odvisni od števila vseh analiziranih celic. Za doseganje ciljne občutljivosti je priporočljivo, da preštejemo med 500000 in 1000000 celic (5). Zato je kakovost vzorca bistvenega pomena, občutljivost zaznave pa znatno znižuje hemodilucija oziroma premajhna količina vzorca.

Pristop k določanju MRD z MFC se med laboratoriji lahko nekoliko razlikuje (način zamejevanja, izbira klonov, fluo- »

rokromov, posebnosti aparata). Ne glede na to pa mora biti končni rezultat medlaboratorijsko povsem primerljiv. Zanesljivost in primerljivost rezultatov potrjujejo tudi sheme mednarodnih kontrol, ki so za MRD pri številnih boleznih že dostopne. Gre torej za zelo zanesljivo in medlaboratorijsko primerljivo metodo, zato se je tudi široko uveljavila.

**MRD AML.** Za določevanje MRD pri bolnikih z AML uporabimo označevalce, ki so značilni za nezrele celice (CD34, CD117), v kombinaciji z označevalci, ki so aberantno izraženi na mieloblastih (CD2, CD7, CD19, CD56). Če je bila izhodiščno postavljena diagnoza akutne monocitne ali mielomonocitne levkemije, uporabimo označevalce, ki so značilni za monocitno vrsto, da določimo delež monocitne vrste v analiziranem vzorcu. Če pri analizi MRD zaznamo levkemične celice in je njihov delež nad 0,1 %, izdamo izvid kot zaznaven MRD. Če je njihov delež pod 0,1 %, je klinični pomen teh preostalih celic zaenkrat neznan, saj je pod klinično prazno vrednostjo. Če levkemičnih celic ne zaznamo, izdamo izvid kot nezaznaven MRD (5).

**MRD ALL.** MFC je uporabna za določanje MRD pri veliki večini bolnikov z ALL. Zato je bila prva metoda sledenja MRD, katere rezultati so služili za postavitve ključnih mejnikov za usmerjanje zdravljenja. Prazna klinična vrednost 0,01 % izhaja iz uporabe štiribarvne pretočne citometrije. Že v devetdesetih letih prejšnjega stoletja se je MRD uveljavila za klinične odločitve pri pediatričnih bolnikih, v zadnjem obdobju pa postaja vse pomembnejša tudi pri odraslih bolnikih z ALL (6). Za določevanje MRD pri B-ALL uporabimo označevalce, ki so značilni za nezrele celice B (CD10, CD19, CD34), v kombinaciji z označevalci, ki so na le-teh aberantno izraženi (CD38, CD44, CD58, CD66c, CD81, CD123). Pri T-ALL iščemo nezrele celice T-celične linije s kombinacijo označevalcev CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, TdT in CD34 (Slika 1). Če pri analizi MRD zaznamo levkemične celice in je njihov delež nad 0,01 %, izdamo izvid kot zaznaven MRD. Če je njihov delež pod 0,01 %, je klinični pomen teh preostalih celic za zdaj neznan, saj je pod klinično prazno vrednostjo.



**Slika 1: Stopenjsko zamejevanje MRD pri bolniku s T-ALL.** Iz analize najprej izločimo celični debris (množica A v razsevnom diagramu A), nato se omejimo na blastno okno (množica B v razsevnom diagramu B) in iščemo izhodiščni imunofenotip T-limfoblastov (z množico C zamejimo dvojno pozitivno (CD7 in CD34) populacijo v razsevnom diagramu C ter z množico MRD zamejimo CD5 pozitivno in CD3 negativno populacijo v razsevnom diagramu D).

**MRD KLL.** Limfomske celice pri kronični limfocitni levkemiji (KLL) imajo značilen imunofenotip, ki se razlikuje od normalnih limfocitov B in večine drugih limfomskih celic. Limfomske celice izražajo celične označevalce B linije CD19, CD20 skupaj s CD5, CD23, CD43, CD200 in ROR1. Če limfomske celice zaznamo, podamo njihov delež, sicer navedemo, da limfomskih celic nismo zaznali. Klinična prazna vrednost je 0,01 %, saj je dokazano, da imajo bolniki s preostalo boleznijo nad to vrednostjo slabše preživetje. Kljub temu pa je določanje MRD v rutinski

klinični praksi zaenkrat odsvetovano, ker ni znano, katere klinične odločitve bi morale biti sprejete ob zaznavnem MRD. Poleg tega so na tržišču nove zdravilne učinkovine, s katerimi dosežemo dober nadzor bolezni, le redki bolniki pa ob tem dosežejo nezaznaven MRD, s čimer postane določanje MRD nesmiselno (7, 8).

**MRD plazmocitom.** Ločevanje med normalnimi plazmatkami in plazmocitomskimi celicami lahko dosežemo z uporabo MFC, ker nobeno izmed uporabljenih proti- »

teles ne loči zanesljivo med normalnimi plazmatkami in plazmocitomskimi celicami. Za določitev MRD uporabljamo protitelesa proti CD38 in CD138 za identifikacijo plazmatk v kombinaciji s CD19, CD27, CD45, CD56, CD81 in CD117 za opredelitev, ali je njihov imunofenotip

normalen ali aberanten. MRD naj bi pri plazmocitomu po novih smernicah obvezno določali, vendar še ni znano, katere klinične odločitve bi morale biti sprejeti ob zaznavnem MRD (9, 10).

## DOLOČANJE MRD Z MOLEKULARNO GENETIKO

Tako kot pri imunofenotipu, lahko tudi pri genetskih označevalcih ločimo dva konceptualno različna označevalca. Prvi je specifični podpis vsakega limfocita, povezan z enkratnostjo preureditev genov za težko verigo imunoglobulinov Ig oziroma T-celični receptor (TcR) med zgodnjo diferenciacijo limfocitov B in T, ko prihaja do združevanj segmentov V, D in J. Nadaljnja enkratnost in raznovrstnost vključujeta še naključne insercije ter delecije nukleotidov na povezovalnih mestih teh segmentov. Ker so notvorbe po opredelitvi klonalne, predstavlja vsaka rakava bolezen limfatične linije ekspanzijo klonalne populacije s specifičnim zapisom Ig/TcR (3). Ig/TcR preureditve tako sodijo med univerzalne označevalce. S pomočjo sekvenciranja omenjenih genov lahko določimo specifično preureditev genov ob postavitvi diagnoze, nato pa ji sledimo. MRD lahko določamo preko enkratnih preureditev teh genov pri večini bolnikov s KLL ter B- in T-ALL. Pri bolnikih z ALL za odkrivanje klonalne populacije s specifičnim zapisom Ig/TcR lahko uporabimo tudi sekvenciranje naslednje generacije (NGS), ki z uporabo univerzalnih začetnih oligonukleotidov omogoča spremljanje vseh preureditev genov Ig/TcR hkrati. S tem zagotavlja popolno sliko ne le o preostalem levkemičnem klonu ampak tudi o normalnem imunskem repertoarju (11).

Druga podvrsta označevalcev so specifične preureditve, povezane s posamezno vrsto oziroma podvrsto bolezni. Največkrat se kot označevalci uporabljajo fuzijski ali mutirani geni oziroma raven njihovega izražanja preko določanja mRNA, iz katere sintetiziramo cDNA. Občutljivost zaznavanja je zaradi intenzivnosti izražanja bistveno večja kot pri uporabi genomske DNA (12).

Za določanje MRD je najbolj razširjena uporaba kvantitativnega RT-PCR (qPCR), ki je v primerjavi z alternativnimi metodama, digitalnim PCR ter NGS, tudi cenejša. MRD izražamo v odstotkih tudi pri molekularno-genetski analizi. Da izničimo vpliv spremenljive kakovosti in

količine RNA, vse analize, temelječe na RT-qPCR, vključujejo uporabo hišnega gena, na katerega normaliziramo vrednost izražanja tarčnega gena. Raven izražanja tarčnega gena se normalizira tako, da izračunamo razmerje med količino prepisa tarčnega (fuzijskega ali mutiranega) gena in referenčnega gena, ki je praviloma *ABL1* (13). To vrednost, ki jo imenujemo normalizirano število kopij (NŠK), pomnožimo s sto, da rezultat izrazimo v odstotkih.

Digitalni PCR (ddPCR) je v rutinskem določanju MRD za zdaj bistveno manj razširjen kot qPCR. Njegova prednost je, da je metoda absolutna, kar omogoča zanesljivo kvantifikacijo tumorskega bremena, ne da bi za vsako določitev posebej pripravljali umeritveno krivuljo (14). Njena slabost pa, da za zdaj ni medlaboratorijsko standardizirana, kar zmanjšuje njeno zanesljivost in ponovljivost. Enako slabost ima pri določanju MRD tudi NGS.

Občutljivost zaznavanja MRD je odvisna od ravni izražanja tarčnega gena posamezne levkemične celice, ki se med bolniki lahko znatno razlikuje (12). Zato je nujno potrebna analiza izhodiščnega vzorca za vsakega bolnika posebej, ker na tej osnovi lahko kasneje izračunamo občutljivost zaznavanja MRD specifično za posameznika. Pri tem drugi pomembni dejavniki, ki vplivajo na občutljivost reakcije, kakršna sta hemodilucija ali slaba regeneracija, niso vključeni, splošno pa zmanjšujejo občutljivost (12). Specifičnost preiskave zagotavljamo tudi z uporabo pozitivnih in negativnih kontrol. Ker so največja težava spremljanja MRD lažno pozitivni rezultati, je eno od pomembnih pravil, da na osnovi enega pozitivnega rezultata ne sprejemamo kliničnih odločitev. Vselej je potrebna potrditev predhodnega rezultata na novem vzorcu po predpisanem časovnem zamiku.

**MRD KML.** Za določanje MRD pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo (KML) kot označevalce uporabljamo različne prepise fuzijskega gena *BCR::ABL1*, ki nastaja »

nejo kot posledica translokacije t(9;22)(q34;q11). Pri KML lahko določamo MRD za tri prepise: e13a2 (b2a2), e14a2 (b3a2) in e1a2. Najbolj pogosta prepisa sta e13a2 in e14a2 (~ 98 % bolnikov), za katera raven izražanja spremljamo v mednarodnem merilu (IS) (15). Raven izražanja se kot zgoraj napisano izračuna v odstotkih, to vrednost nato pomnožimo s konverzijskim faktorjem, ki ga laboratorij pridobi z mednarodnimi primerjavami oziroma ga določi s pomočjo standardov. Tako izražen rezultat je medlaboratorijsko primerljiv (16). Ob diagnozi določimo raven izražanja fuzijskega gena *BCR::ABL1* v venski krvi, kar kasneje pri sledenju MRD služi za določitev molekularnega odziva (MR) na tarčno zdravljenje s tirozin kinaznimi inhibitorji (TKI). Izhodiščna točka mednarodnega merila je vrednost 100 %

IS, ki pomeni povprečno standardizirano začetno vrednost izražanja fuzijskega gena *BCR::ABL1* nezdravljenih bolnikov s KML. 0,1 % IS je za tri desetiške logaritme zmanjšana vrednost glede na izhodiščno in je privzeta kot glavni MR (MMR = 3.0) na zdravljenje. Doseganje stabilnega MMR je cilj zdravljenja in naj bi ga bolniki dosegli po 12 do 18 mesecih od začetka zdravljenja. Določitev MR 4.0 do MR 5.0 predstavlja globoki MR (15). Preiskavo izvajamo vsake tri mesece do potrjenega stabilnega MMR in nato trajno vsake tri do šest mesecev. Zmanjšanje MR je vedno razlog za skrbnejše spremljanje bolnika in morebitno spremembo načina zdravljenja. V Tabeli 1 prikazujemo odvisnost MR od IS glede na čas od začetka zdravljenja s TKI in pričakovani odziv na zdravljenje.

**Tabela 1:** Sledenje MRD pri KML po začetku zdravljenja s TKI in pričakovani molekularni odziv v mednarodnem merilu (IS). MMR – glavni molekularni odziv; TKI – tirozin kinazni inhibitor.

Čas od začetka zdravljenja s TKI (meseči)	Pričakovano zmanjšanje izražanja <i>BCR::ABL1</i>	<i>BCR::ABL1/ABL1</i> (% IS)	Molekularni odziv (MR)
3	1 log	≤ 10,0	1.0
6	2 log	≤ 1,0	2.0
<b>12</b>	<b>3 log</b>	<b>≤ 0,1</b>	<b>3.0 (MMR)</b>
> 18	4 log	≤ 0,01	4.0
	4.5 log	≤ 0,0032	4.5
	5 log	≤ 0,001	5.0

**MRD AML.** MRD lahko določamo z molekularno-genetskimi preiskavami pri tistih bolnikih z AML, pri katerih prepoznamo zanesljiv genetski označevalec. Pri AML imamo štiri zanesljive molekularne označevalce, za katere imamo smernice o časovnih razmikih spremljanja, znani so tudi klinični posegi. Kot označevalec je najdlje v uporabi fuzijski gen *PML::RARA* (t(15;17)(q24;q21)) pri akutni promielocitni levkemiji (APL). MRD lahko spremljamo za prepise bcr1, bcr2 in bcr3 (17). V zadnjih dveh letih smo dobili tudi smernice za spremljanje AML s tremi drugimi genetskimi preureditvami. Pri AML z različicami v genu *NPM1* lahko spremljamo MRD pri različicah, ki jih označujemo kot A, B in D. Pri akutni mielomonocitni levkemiji

z eozinofilijo imamo fuzijski gen *CBFB::MYH11* (inv(16)(p13q22)), pri katerem lahko spremljamo prepise A, D in E. Ustrezen označevalec je tudi fuzijski gen *RUNX1::RUNX1T1* (t(8;21)(q22;q22)). Skupno najdemo molekularni označevalec pri približno 40 % AML (3).

Zaradi boljše občutljivosti je najprimernejši vzorec pri vseh AML kostni mozeg. Preiskavo lahko izvedemo tudi v vzorcu venske krvi (pri vsaj  $10 \times 10^9/L$  levkocitih in vsaj 20 % blastov), vendar ne pri APL. MRD spremljamo po dveh ciklih terapije, ob koncu terapije, nato pa vsake 3 mesece naslednjih 24 mesecev. Če MRD spremljamo na vzorcu venske krvi, to izvajamo bolj pogosto, na 4–6 tednov (5).

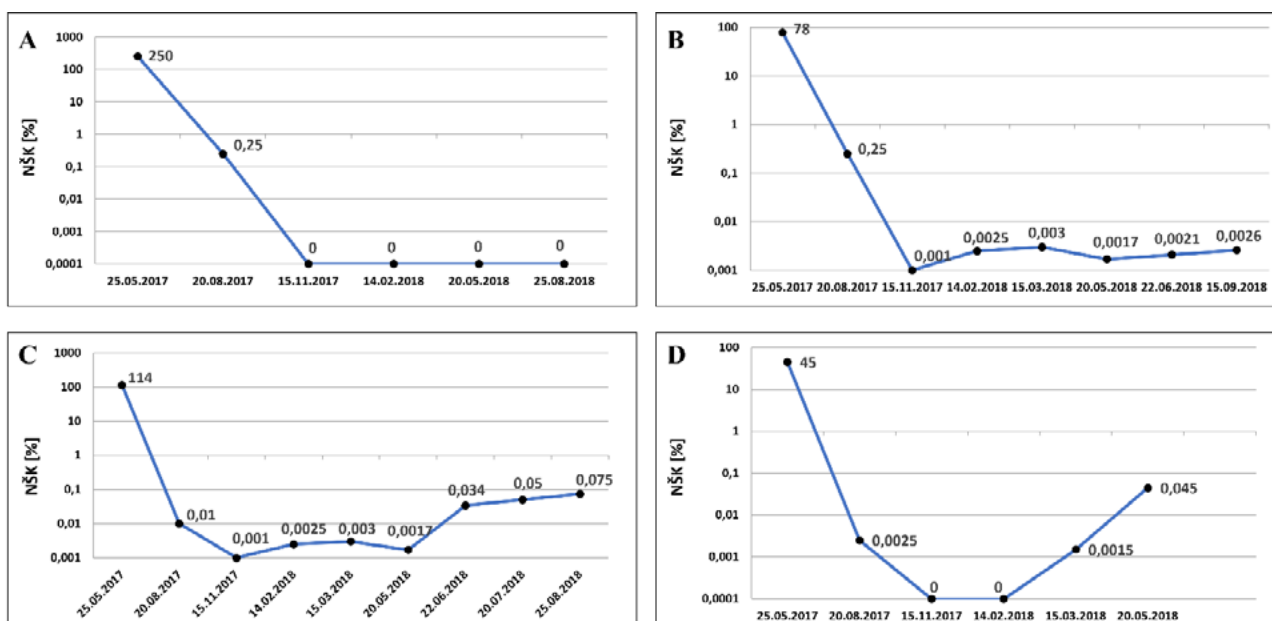
»



MRD razlagamo glede na predhodne rezultate preiskave kot (Slika 2):

- popolna molekularna remisija: dva zaporedna nezaznavna rezultata MRD, pridobljena v intervalu  $\geq 4$  tednov;
- molekularno vztrajanje pri nizkem številu kopij: relativno povečanje izražanja med dvema pozitivnima rezultatoma po koncu terapije, ki pa je manjše od desetiškega logaritma;

- molekularno napredovanje: povečanje števila kopij med dvema pozitivnima vzorcema pri bolnikih z molekularnim vztrajanjem pri nizkem številu kopij;
- molekularni relaps: povečanje števila kopij, ki je večje od desetiškega logaritma med dvema pozitivnima vzorcema pri bolnikih, ki so bili prej MRD nezaznavni.



**Slika 2: Razlaga MRD glede na predhodne rezultate preiskave.** A) Popolna molekularna remisija; B) molekularno vztrajanje pri nizkem številu kopij; C) molekularno napredovanje in D) molekularni relaps. NŠK – normalizirano število kopij.

Pri bolnikih z AML, pri katerih nismo našli nobenega od zgoraj naštetih označevalcev, lahko uporabimo katero od drugih genetskih sprememb, ki smo jo odkrili ob postavitvi diagnoze. Najpogosteje spremljamo točkovne mutacije v določenih genih, ki jih večinoma najdemo z uporabo NGS (18). Primeren označevalec za spremljanje z NGS je tisti, ki ima ob postavitvi diagnoze alelna frekvenca vsaj 5 %. Pokritost različice, ki jo spremljamo, mora biti od  $10^3$ – $10^6$ . Pri tem je pomembno, da vemo, kateri geni niso primerni za sledenje MRD. Geni *DNMT3A*, *ASXL1* in *TET2* niso primerni označevalci, ker v njih lahko pride do pojavnosti različic v procesu staranja oziroma pojavnosti klonalne hematopoeze. Zarodne različice (alelna frekven-

ca ob diagnozi  $\geq 50$  %) v genih *RUNX1*, *GATA2*, *CEBPA*, *DDX41* in *ANKDR26* prav tako niso primerni označevalci (5). Spremljanje MRD z NGS, ki ga praviloma izvajamo na vzorcu kostnega mozga, je izvedbeno in interpretacijsko zahtevno, pri čemer merila za interpretacijo rezultatov za zdaj niso jasna.

**MRD ALL.** Za določevanje MRD pri bolnikih z B-ALL uporabljamo nekatere fuzijske gene. Fuzijski gen *BCR::ABL1* je prisoten pri  $\sim 30$  % odraslih bolnikov z B-ALL, pri čemer je pri  $\sim 70$  % bolnikov to prepis e1a2, pri 30 % e13a2 ali e14a2. Spremljamo lahko vse tri prepise, rezultata pa ne podajamo v mednarodnem merilu, pač pa v odstotkih kot



pri AML. Ostala dva označevalca za spremljanje MRD pri bolnikih z B-ALL sta fuzijska gena *ETV6::RUNX1* (t(12;22)

(p13;q22)) in *TCF3::PBX1* (t(1;19)(q23;p13)) (2, 10). Najprimernejši vzorec je kostni mozeg.

## IZZIVI ZA PRIHODNOST

Zgodovinsko gledano se je določanje MRD razvilo in je danes splošno uveljavljeno pri spremljanju uspešnosti zdravljenja bolnikov s KML. Dlje časa je v redni rutinski uporabi tudi pri pediatričnih in zadnja leta tudi pri odraslih bolnikih z ALL (12). Smernice za določanje smo nedavno dobili pri AML (5) ter KLL (7, 19). Precej študij je tudi pri plazmocitomu, kjer pa je vloga MRD težavna tako z izvedbenega kot aplikativnega vidika. Navkljub izjemni občutljivosti obeh metod pa nezaznani MRD ni zagotovilo, da bolezen ni več prisotna, kar v prihodnosti kliče po razvoju še bolj občutljivih metod (7).

Večina kliničnih laboratorijev rutinsko izvaja obe trenutno najzanesljivejši metodi, qPCR in MFC. Rezultate katere metode bo klinik uporabil pri svojih terapevtskih odločitvah, je najprej odvisno od bolezni same, potem pa tudi od specifičnih značilnosti bolezni pri posameznem bolniku. Pri nekaterih boleznih je uporaba metode nedvoumna. Pri KML je to qPCR (16), pri DP zaenkrat le MFC (10). Pri AML so smernice jasne, da bolnikom, pri katerih smo določili enega od štirih zanesljivih molekularnih označevalcev, sledimo s qPCR, medtem ko pri ostalih bolnikih metodo izbiramo na osnovi prisotnih označevalcev (5). Pri ALL se je zaradi hitrosti in splošne uporabnosti bolj uveljavila MFC. Ko je mogoče sledenje z obema metodama, je smiselno, da izberemo bolj občutljivo in/ali bolj specifično glede na prisotne označevalce. Istočasna uporaba obeh ni smiselna, je pa tudi zelo draga. Zato je tesno sodelovanje med laboratorijskimi strokovnjaki in hematologi tako pri izbiri najustreznejše metode za spremljanje posameznega bolnika kot tudi za interpretacijo rezultatov MRD izjemno pomembno.

Opozoriti gre na nekatere omejitve določanja MRD, ki so povezane z lastnostmi bolezni. Če gre za bolezen, ki je omejena le na kostni mozeg, kakršna je npr. akutna levkemija, je določanje bistveno bolj zanesljivo kot pa npr. pri KLL, ki vključuje več mest (kri, kostni mozeg, limfatično tkivo) (20). Verjetno največja težava MRD splošno pa je klonalna evolucija. Zdravljenje praviloma povzroči tudi selekcijo klonov, s tem pa lahko pride do spremembe označevalcev. Čeprav so izbrani označevalci zelo stabilni in sorazmerni z bolezenskim bremenom, klonalna evolucija lahko povzroči spremembo izražanja posameznega označevalca ali njegovo izgubo. Drug izziv pa so nove oblike zdravljenja, ki ciljajo prav na označevalce MRD, bodisi monoklonska protitelesa (anti-CD20) ali celična terapija CAR-T (CD19) (3). S tem povzročijo zasedbo ali izgubo označevalcev in nezanesljivo sledenje MRD.

V nasprotju z levkemijami in limfomi, pri katerih že standardna kemoterapija navadno vodi v popolno remisijo bolezni, pa pri bolnikih s solidnimi tumorji popolnih remisij na ta način navadno ne dosežemo. Uvedba tarčnih terapij pa je povzročila dramatične spremembe v zdravljenju in spremljanju zdravljenja v onkologiji splošno. Tako je ocena popolne remisije, s tem pa tudi pojem MRD, postala aktualna pri spremljanju številnih bolnikov z rakom (21). Nedvomno je torej določanje MRD eno od razvijajočih se področij, pri katerem je število preiskav v porastu, z njim pa tudi število izzivov. »

## LITERATURA

- Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, Ossenkuppe GJ, Walter RB. Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2017;31:1482-1490.
- Kruse A, Abdel-Azim N, Kim HN, Ruan Y, Phan V, Ogana H, Wang W, Lee R, Gang EJ, Khazal S, Kim YM. Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):1054.
- Gaipa G, Basso G, Biondi A, Campana D. Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2013;84(6):359-69.
- Rizzari C, Cazzaniga G, Coliva T, De Angelis C, Conter V. Predictive factors of relapse and survival in childhood acute myeloid leukemia: role of minimal residual disease. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011;11(9):1391-401.
- Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018; 131(12):1275-1291.
- Kruse A, Abdel-Azim N, Kim HN, Ruan Y, Phan V, Ogana H, et al. Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):1054.
- Wierda WG, Rawstron A, Cymbalista F, Badoux X, Rossi D, Brown JR, Egle A et al. Measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia: expert review and consensus recommendations. *Leukemia* 2021. 35(11):3059-3072.
- Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Niemann CU, Kate AP, M. et al. Chronic Lymphocytic Leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2020; 32(1): 23-33.
- Romano A, Palumbo GA, Parrinello NL, Conticello C, Martello M, Terragnet C et al. Minimal Residual Disease Assessment Within the Bone Marrow of Multiple Myeloma: A Review of Caveats, Clinical Significance and Future Perspectives. *Frontiers in Oncology*. 2019; 9: 699.
- Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, Mateos MV, Zweegman S, Cook G, et al. Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2021; 32(3): 309-322.
- Della Starza ID, Chiaretti S, De Propriis MS, Elia L, Marzia Cavalli M, De Novi LA, et al. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Technical and Clinical Advances. *Front. Oncol*. 2019; 9:726.
- Dillon R, Potter N, Freeman S, Russell N. How we use molecular minimal residual disease (MRD) testing in acute myeloid leukaemia (AML). *Br J Haematol*. 2021;193(2):231-244.
- Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—A Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003;17:2318–2357.
- Drandi D, Ferrero S, Ladetto M. Droplet Digital PCR for Minimal Residual Disease Detection in Mature Lymphoproliferative Disorders. *Methods Mol Biol*. 2018;1768:229-256.
- Hochhaus A, Bacarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34:966–984.
- Cross NPC, White HE, Colomer D, Echenrona H, Foroni L, Gottardi E, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29:999-1003.
- Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424–447.
- Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, Al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378: 1189e1199.
- Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, Letestu R, Nomdedeu J, Palacio C, et al. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. *Leukemia*. 2016;30(4):929-36.
- Wierda WG. Minimal Residual Disease Provides Treatment Focus for Next Chronic Lymphocytic Leukemia Advances. *J Clin Oncol*. 2016;34(31):3722-3723.
- Luskin MR, Murakami MA, Manalis SR, Weinstock DM. Targeting minimal residual disease: a path to cure? *Nat Rev Cancer*. 2018;18(4):255-263.

# Novejša spoznanja na področju presnove lipoproteinov

## *Recent advances in lipoprotein metabolism*

**Štefka Krivec**

Splošna bolnišnica Celje, Oddelek za laboratorijsko medicino

Avtor za korespondenco:

**Mag. Štefka Krivec, mag. farm., spec. med. biokem., EuSpLM**

Splošna bolnišnica Celje, Oblakova ulica 5, Celje

e-pošta: stefka.krivec@sb-celje.si

### POVZETEK

Srčno-žilne bolezni so v svetu še vedno glavni vzrok smrtnosti. Dejavnikov tveganja za njihov razvoj je mnogo; eden pomembnejših so dislipidemije (zvišane ali znižane vrednosti lipoproteinov). Dislipidemije so lahko posledica nekaterih obolenj (sekundarne), največkrat pa so posledica medsebojnega delovanja genetskih in okoljskih dejavnikov (primarne). V članku so opisane poti presnove lipoproteinov, v katere so vključeni številni lipoproteinski receptorji, membranski transporterji, encimi in transportni proteini. Mnoge od njih poznamo že dolgo, odkrivajo pa se novi. Razumevanje molekularnih in genetskih mehanizmov presnove lipoproteinov je osnova za raziskovanje patofiziologije dislipidemij in ima pomembno klinično uporabnost. Razvijajo se nova zdravila, ki se lahko uporabljajo v kombinaciji s statini za nižanje serumskega LDL-holesterola in nadaljnje zmanjševanje tveganja za srčno-žilne bolezni (primer inhibitorja PCSK9). Večje poznavanje presnove lipoproteinov bo v prihodnosti odprlo možnosti za ciljano, posamezniku prilagojeno zdravljenje dislipidemij.

**Ključne besede:** lipoproteini, dislipidemija, lipoproteinski receptorji, membranski transporterji, PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)

### ABSTRACT

Cardiovascular diseases are still the leading cause of death in the world. There are many risk factors for their development; one of the most important is dyslipidemia (increased or decreased lipoprotein levels). Dyslipidemias can be caused by certain diseases (secondary), but most often they are due to the interaction of genetic and environmental factors (primary). The paper describes lipoprotein metabolism pathways involving a number of lipoprotein receptors, membrane transporters, enzymes, and transport proteins. We have known many of them for a long time, but new ones are being discovered. Understanding the molecular and genetic mechanisms of lipoprotein metabolism is the basis for exploring the pathophysiology of dyslipidemias and has important clinical applications. New drugs are being developed that can be used in combination with statins to lower serum LDL-cholesterol and further reduce the risk of cardiovascular disease (the case of the PCSK9 inhibitor). Greater knowledge of lipoprotein metabolism will in the future open possibilities for targeted individualized treatment of dyslipidemias.

**Key words:** lipoproteins, dyslipidemia, lipoprotein receptors, membrane transporters, PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)

»

## UVOD

Lipoproteini so transportna oblika lipidov v krvi. Običajno so okrogli delci z več nepolarnimi lipidi v jedru (trigliceridi – TG in holesterol-estri – HE) in bolj polarnimi lipidi blizu njihove površine (fosfolipidi – PL in prosti holesterol). Vsebujejo tudi enega ali več specifičnih proteinov, imenovanih apolipoproteini, ki se običajno nahajajo na površini delcev.

Plazemske lipoproteine razdelimo na sedem razredov glede na velikost, gostoto, lipidno sestavo in vrsto apolipoproteinov (Tabela 1) (1, 2):

- hilomikroni,
- ostanki hilomikronov,
- lipoproteini zelo nizke gostote (VLDL),
- lipoproteini srednje gostote (IDL),
- lipoproteini nizke gostote (LDL),
- lipoproteini visoke gostote (HDL) in
- lipoprotein a (Lp(a)).

**Tabela 1:** Glavne značilnosti posameznih lipoproteinskih delcev – prirejeno po (1)

**Table 1:** Main characteristics of individual lipoprotein particles – adapted from (1)

Lipoprotein	Gostota (g/mL)	Velikost (nm)	Prevladujoči lipid	Glavni apolipoproteini (apo)	L/P (%)	EF
Hilomikroni	pod 0,930	75-1200	TG	B-48, C, E, A-I, A-II, A-IV	99/1	ne potuje
Ostanki hilom.	0,930 – 1,006	30-80	TG, HOL	B-48, E		
VLDL	0,930 - 1,006	30-80	TG	B-100, E, C	90/10	pre-β
IDL	1,006 – 1,019	25-35	TG, HOL	B-100, E, C	85/15	pre-β-β
LDL	1,019 - 1,063	18-25	HOL	B-100	80/20	β
HDL	1,063 - 1,210	5-12	HOL, PL	A-I, A-II, C, E	50/50	α
Lp(a)	1,055 – 1,085	cca 30	HOL	B-100, apo (a)		pre-β

Lipoproteini vsebujejo različna razmerja lipidov in proteinov (L/P), zato se razlikujejo po fizikalnih in kemijskih lastnostih. Večji lipoproteini imajo večje jedro in nosijo več TG in HE. Več kot je v lipoproteinu lipidov v primerjavi s proteini, manjšo gostoto imajo. Ostanki hilomikronov, VLDL, IDL, LDL in Lp(a) so proaterogeni lipoproteini, medtem ko je HDL antiaterogen. Frakcija LDL se sestoji iz spektra delcev, ki se razlikujejo po velikosti in gostoti. Manjši LDL delci so gostejši in bolj aterogeni. Tudi HDL delci so heterogena skupina, ki se razlikujejo po obliki, velikosti, gostoti, naboju in glede na vrsto vsebujočih apolipoproteinov. Lp(a) je poseben razred lipoproteinov, ki je strukturno podoben LDL (1, 2).

Lipoproteine ločimo z metodo elektroforeze (EF) na agaroznem gelu in na drugih nosilcih v več frakcij. Pri pH 8,6 potuje HDL z α-globulini, LDL z β-globulini, VLDL in Lp (a) med α- in β-globulini (pre-β-globulinska frakcija). IDL tvori širok pas med β- in pre-β-globulini. Hilomikroni ostanejo na mestu aplikacije. To je osnova za razvrstitev lipoproteinov: pre β-lipoprotein (VLDL), β-lipoprotein (LDL) in α-lipoprotein (HDL). Z ultracentrifugo jih ločimo glede na gostoto (2). »

## APOLIPOPROTEINI

Apolipoproteini (apo) igrajo ključno vlogo v presnovi lipoproteinov. Njihove bistvene značilnosti so povzete v Tabeli 2 (1).

**Tabela 2:** Vrste apolipoproteinov in njihove glavne značilnosti

**Table 2:** Types of apolipoproteins and their main characteristics

Apolipoprotein	Molekulska masa (Da)	Primarni vir	Lipoprotein	Funkcija
<b>Apo A-I</b>	28.000	jetra, črevesje	HDL, hilomikron	strukturni protein v HDL, aktivator LCAT
<b>Apo A-II</b>	17.000	jetra	HDL, hilomikron	strukturni protein v HDL, aktivator HL
<b>Apo A-IV</b>	45.000	črevesje	HDL, hilomikron	neznana
<b>Apo A-V</b>	39.000	jetra	VLDL, hilomikron, HDL	aktivator LPL
<b>Apo B-48</b>	241.000	črevesje	hilomikron	strukturni protein v hilomikronu
<b>Apo B-100</b>	512.000	jetra	VLDL, IDL, LDL, Lp(a)	strukturni protein, ligand za LDLR
<b>Apo C-I</b>	6.600	jetra	hilomikron, VLDL, HDL	aktivator LCAT
<b>Apo C-II</b>	8.800	jetra	hilomikron, VLDL, HDL	kofaktor za LPL
<b>Apo C-III</b>	8.800	jetra	hilomikron, VLDL, HDL	inhibitor LPL in prevzema lipoproteinov
<b>Apo E</b>	34.000	jetra	ostanki hilom., IDL, HDL	ligand za LDLR
<b>Apo (a)</b>	250.000–800.000	jetra	Lp(a)	inhibitor aktivacije plazminogena

LCAT – Lecitin holesterol acil transferaza; HL – Jetrna lipaza; LPL – Lipoprotein lipaza; LDLR – LDL receptorji.

Vsak razred lipoproteinov ima različne apolipoproteine v različnih razmerjih, z izjemo LDL, ki vsebuje samo apo B-100. Apolipoproteini opravljajo pomembne funkcije: vzdržujejo strukturno celovitost lipoproteinov, aktivirajo ali zavirajo pomembne encime v presnovnih poteh lipoproteinov ali so ligandi celičnih receptorjev.

Večina apolipoproteinov ima strukturo, imenovano amfipatska vijačnica, zaradi česar se lahko vežejo na lipide. Vezava vijačnic na lipoproteine je sorazmerna šibka, kar omogoča izmenjavo apolipoproteinov med različnimi lipoproteini v procesu presnove lipoproteinov.

Najvidnejšo vlogo v presnovi lipoproteinov igrajo:

- Apo A-I je pomemben strukturni element HDL delca in aktivira encim lecitin holesterol acil transferazo (LCAT), s pomočjo katerega se holesterol v HDL esterificira;
- Apo B obstaja v dveh oblikah: kot apo B-48, ki nastaja v tankem črevesju in je strukturna komponenta hilomikronov ter apo B-100, ki nastaja v jetrih in je glavna strukturna sestavina VLDL in LDL. Za razliko od drugih apolipoproteinov se apo B-100 ne more premakniti z enega lipoproteinskega delca k drugemu, ker ima poleg treh alfa-vijačnih domen tudi dve dolgi  $\beta$ -domeni, to je strukturo z veliko večjo afiniteto za lipide. Apo B-100 je polipeptid z več kot 4500 aminokislinami, apo B-48

»

pa je okrnjena oblika apo B-100;

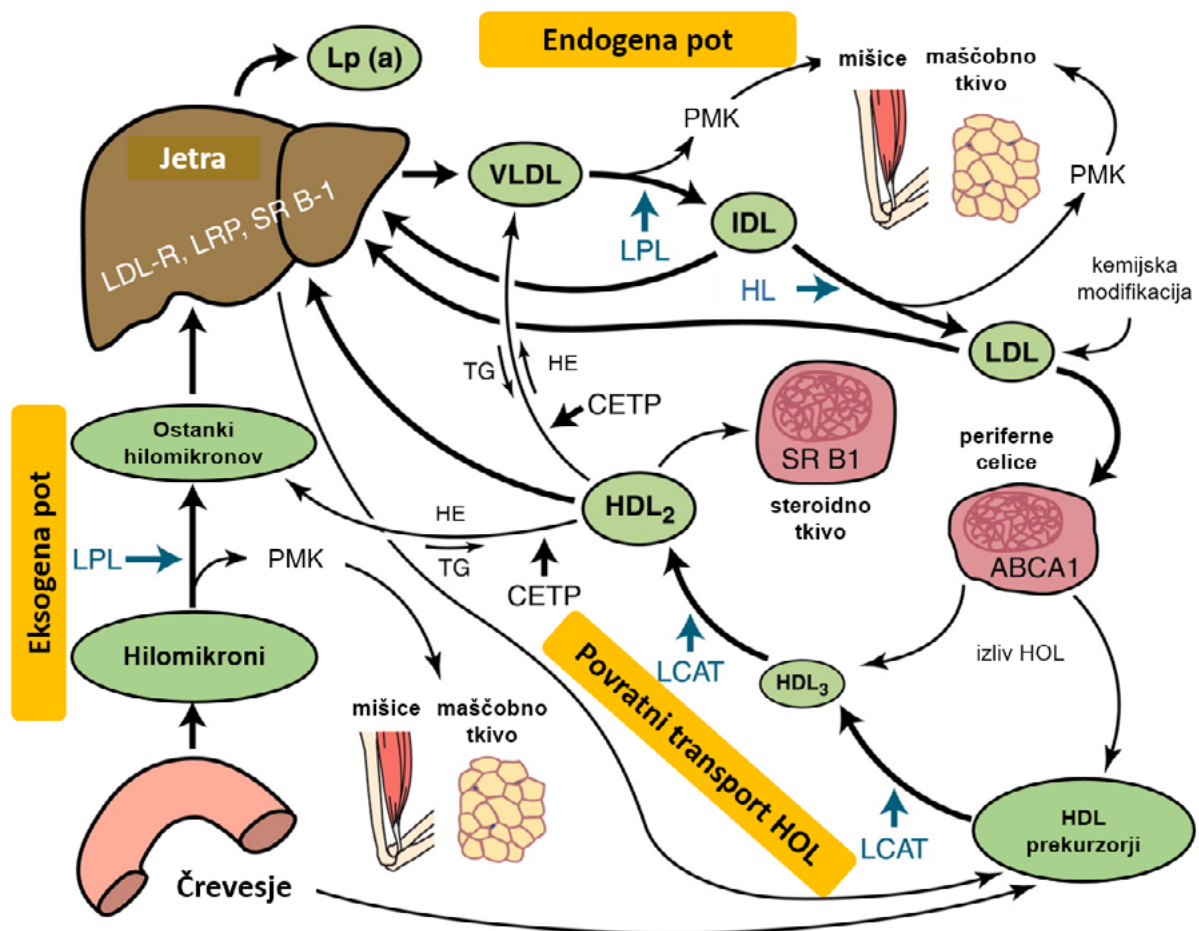
- Apo C-II je aktivator encima lipoprotein lipaze (LPL), ki hidrolizira TG v hilomikronih in VLDL;
- Apo E je ligand za celične receptorje in igra osrednjo vlogo v presnovi ostankov hilomikronov in ostankov

VLDL. Poznamo tri genetske različice apo E: apo E2, E3 in E4. Razlikujejo se po sposobnosti vezave na LDL receptorje (LDLR) ter na LDL receptorjem podobne proteine (LRP) (3).

## PRESNOVA LIPOPROTEINOV

V presnovo lipoproteinov so vključeni številni lipoproteinski receptorji, membranski transporterji ter encimi in transportni proteini. Poti presnove so zapletene in se križajo na več točkah (Slika 1) (4). Vključujejo eksogeno in endogeno

pot glede na to, ali prenašajo perifernim celicam lipide iz prehrane ali lipide jetrnega izvora. Vključena sta tudi prevzem LDL iz krvnega obtoka s pomočjo LDLR in povraten transport holesterola iz perifernih celic v jetra (3, 4).



Slika 1: Poti presnove lipoproteinov. Razlaga kratic je del teksta. Prirejeno po (4).

Figure 1: Pathways of lipoprotein metabolism. The explanation of abbreviations is part of the text. Adapted from (4).





## Eksogena pot

Eksogena pot se začne v črevesju z absorpcijo lipidov. Maščobe se v lumnu črevesja emulgirajo s pomočjo žolčnih kislin, encimi v črevesju (pankreasna lipaza) jih razgradijo v bolj polarne oblike (proste maščobne kisline – PMK in monoacilglicerole). Transport molekul preko membrane enterocita poteka z difuzijo ali s pomočjo transportnih proteinov. Prevzem holesterola preko membrane pospešuje transporter NPC1L1 (angl. *Niemann-Pick C1-like 1 protein*). Ko je holesterol v enterocitu, se lahko prenaša nazaj v svetlino črevesja s pomočjo transportnih proteinov ABCG5 in ABCG8 (angl. *ATP-binding cassette transporter G5 in G8*), večina holesterola pa se na membrani endoplazmatskega retikulu (ER) esterificira s pomočjo encima acil CoA: holesterol aciltransferaza (ACAT). Na ER se maščobne kisline in monogliceridi uporabijo za ponovno sintezo TG (3, 5). Na površini ER pride tudi do sinteze in posttranslacijske modifikacije apo B-48. Za prenos lipidov na apo B-48 je potreben mikrosomalni protein (angl. *microsomal triglyceride transfer protein; MTP*) (6). Nastanejo začetni hilomikronski delci, katerim se dodajo še fosfolipidi in apo A-IV. Na novo sintetizirani hilomikroni se z ER s pomočjo transportnih mešičkov (angl. *prechylomicron transport vesicle; PCTV*) prenesejo v Golgijev aparat, kjer delci pridobijo še apo A-I (7). Popolnoma sestavljeni lipoproteini se preko limfnih žil prenesejo v sistemsko cirkulacijo (3, 8).

Ezetimib je zdravilo, ki se veže na NPC1L1 in zavira njegovo aktivnost. Posamezniki z okvarjenima transportnima proteinoma ABCG5 in ABCG8 imajo bolezen, imenovano "sitosterolemija" in so nagnjeni k aterosklerozi zaradi povečane absorpcije holesterola in drugih sterolov (9).

Odsotnost MTP povzroči nezmožnost tvorbe hilomikronov (abetalipoproteinemija). Zdravilo lomitapid zavira delovanje MTP in se uporablja za zdravljenje bolnikov s homozigotno družinsko hiperholesterolemijo (FH) (10).

Hilomikroni v krvi prevzamejo od HDL delcev vse tri oblike apo C in apo E. Ko pridejo v stik s proteoglikani na površini kapilar različnih tkiv apo C-II v hilomikronih aktivira LPL. LPL hidrolizira trigliceride (11). S tem se zmanjša volumen jedra hilomikronov in izvede se prenos fosfolipidov, prostega holesterola ter apo C na HDL. Maščobne kisline, ki nastanejo s hidrolizo TG, prevzamejo mišične celice kot vir energije ali pa se shranijo v maščobnih celicah. Ostanke hilomikronov nosijo na svoji površini

apo E, ki ga prepoznajo specifični jetrni receptorji, preko katerih se prenesejo v jetra, sestavni deli ostankov hilomikronov pa se hidrolizirajo znotraj lizosomov (12).

Poleg apo C-II obstajajo tudi druge molekule, ki aktivirajo delovanje LPL. Izguba funkcij zaradi bolezenskih genetskih sprememb LPL, apo C-II, GPIHPB1 (angl. *glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL binding protein 1*), LMF1 (angl. *lipase maturation factor 1*) in apo A-V lahko povzroči izrazito hilomikronemijo z zvišanimi TG. Obratno pa bolezenske spremembe genov, ki kodirajo proteine, ki fiziološko zavirajo aktivnost LPL, kot so apo C-III, apo A-II ter angiopoetinu podobne proteine 3 in 4 (angl. *angiopoietin-like proteins 3 in 4; ANGPTL 3 in 4*), povečajo aktivnost LPL in tako pride do znižanja ravni TG v plazmi (3, 13). Genetske spremembe, ki vodijo v nastanek izoforme apo E2, lahko povzročijo zmanjšan očistek hilomikronov in zvišane ravni holesterola in TG v plazmi (družinska disbetalipoproteinemija) (14).

## Endogena pot

Začne se v jetrih s sintezo VLDL. Hitrost sinteze VLDL je odvisna od količine razpoložljivih TG. Pri sestavljanju VLDL sta potrebna še apo B-100 in MTP. MTP prenaša endogene TG in HE na apo B-100. Tudi VLDL se s pomočjo transportnih mešičkov prenesejo iz ER v Golgijev aparat, kar je predpogoj za njihovo končno izločanje iz hepatocitov (3, 15).

Bolezenske spremembe gena MTP (in/ali apo B) povzročijo zmanjšano tvorbo VLDL ter izrazito znižanje holesterola in TG v plazmi (abetalipoproteinemija, hipobetalipoproteinemija) (16).

VLDL delci nosijo na svoji površini poleg apo B-100 tudi apo E in majhne količine apo C. Ko vstopijo v kri, se še obogatijo z apo C iz HDL delcev. Apo C-II na površini VLDL aktivira LPL na endotelijskih celicah, kar vodi do hidrolize TG v VLDL in sproščanje prostih maščobnih kislin. Apo C iz VLDL se prenesejo na HDL, delci VLDL pa se pretvorijo v IDL, ki se še obogatijo z apo E iz HDL delcev. Pri ljudeh se približno polovica IDL odstrani iz obtoka z vezavo na jetrne receptorje, ki prepoznajo apo E, preostali del IDL pa je podvržen nadaljnji hidrolizi TG s pomočjo jetrne lipaze (HL) (3, 17). Vsi apolipoproteini, z izjemo apo B-100, se prenesejo na druge lipoproteine, kar na koncu privede do nastanka LDL. LDL je glavni lipoprotein, ki dostavlja eksogeni holesterol do perifernih tkiv (3).

»

## Vloga LDL receptorjev

Dve tretjini LDL delcev se izločata iz krvnega obtoka preko družine receptorjev LDL (LDLR) v jetrih, približno tretjina pa prehaja v zunajžilni prostor žilne stene, kjer se lahko oksidirajo, nato jih prevzamejo ekstrahepatična tkiva (makrofagi) preko čistilnih receptorjev. V makrofagih pride do kopičenja lipidov. Makrofage, zapolnjene s HE, imenujemo penaste celice, ki imajo pomembno vlogo v zgodnjih stopnjah razvoja ateroskleroze. Nereceptor-ski način prevzema LDL v plazmi, ki ni uravnavan in se ne more zasititi, postane pomemben, ko so plazemske koncentracije LDL zvišane (3, 18).

Nivo LDL v plazmi je odvisen od hitrosti njegove sinteze in hitrosti njegovega izločanja, kar je uravnavano s številom LDLR v jetrih, na število LDLR pa vpliva količina HOL v hepatocitu (3).

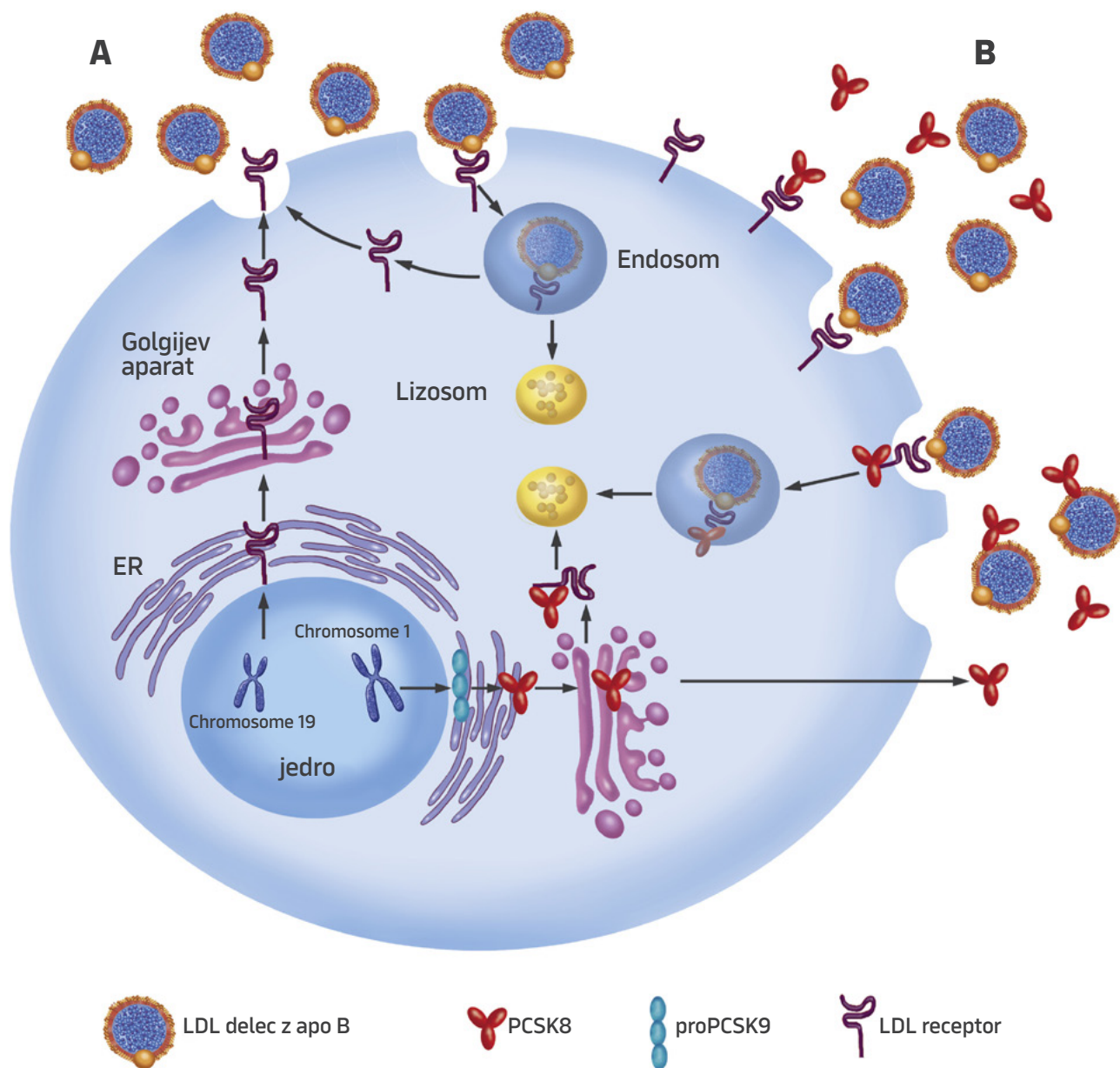
LDLR prepoznajo apo B v LDL, zaradi česar se delci LDL z endocitozo prenesejo v celico (Slika 2 A) (19). Zaradi kislega okolja v endosomu se LDL sprosti z receptorja, receptor se vrne na površino celice za ponovno uporabo, LDL pa se seli v lizosom. Tu se apo B-100 razgradi v peptide in aminokisliline, hidrolizirajo se tudi HE. Nastali

holesterol je na voljo za sintezo celičnih membran, sintezo steroidnih hormonov v endokrinih tkivih ali za sintezo žolčnih kislin v hepatocitih. Prekomerna količina prostega holesterola:

- zmanjšuje hitrost sinteze endogenega holesterola z zaviranjem encima HMG-CoA reduktaze (angl. *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase*), ključnega encima v biosintezi holesterola;
- povečuje tvorbo HE s procesom, ki ga katalizira ACAT in
- zavira sintezo novih LDLR, s čimer se vnos LDL v celico zmanjša (3, 20).

Pri zmanjševanju števila LDLR na membrani igra pomembno vlogo encim PCSK9 (angl. *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*). PCSK9 se veže z LDLR in spodbudi njihovo lizosomsko razgradnjo, saj se katalitična domena PCSK9 lahko veže z EGF-domeno LDLR in ga preusmeri iz endosoma v lizosom. Zaradi konformacijske spremembe se LDL v celici ne more odcepiti od LDLR. LDLR se zato ne more vrniti na celično membrano, kjer bi omogočil endocitozo naslednjega LDL delca (Slika 2 B) (21, 22). »





Slika 2: Življenjski krog PCSK9 in učinek na razgradnjo LDL. Razlaga kratic je del teksta. Prirejeno po (19).

Figure 2: The PCSK9 lifecycle and effect on LDL catabolism. The explanation of the abbreviations is part of the text. Adapted from (19).

Za koordinirano genetsko uravnavanje presnove holesterola je na voljo veliko različnih znotrajceličnih poti, vendar se zdi, da igrajo osrednjo vlogo s steroli uravnnavani transkripcijski dejavniki (angl. *sterol regulatory element binding protein*; *SREBP*), ki zaznavajo znotrajcelične koncentracije holesterola (3, 23).

Vsaka nenormalnost v funkciji LDLR povzroči zvišanje LDL v krvi. Pacient, ki je heterozigot za FH, ima le polovico funkcionalnih LDLR, zaradi česar je zmanjšan prevzem LDL v jetrih. Zato se zveča sinteza holesterola v jetrih, LDL pa se kopiči v plazmi. »

Statini so zdravila, ki zavirajo sintezo endogenega holesterola z delovanjem na encim HMG-CoA reduktazo, kar vodi tudi v zvišanje števila jetrnih membranskih LDLR. Genetske spremembe, ki vodijo v izgubo funkcije PCSK9, povzročijo povečano aktivnost LDLR in znižanje ravni LDL. Nasprotno pa genetske spremembe, ki povečajo funkcijo PCSK9, privedejo do zmanjšanja aktivnosti LDLR in zvišanja ravni LDL. Zaviralci PCSK9 so zdravila, ki v kombinaciji s statini pomembno znižajo LDL-holesterol v plazmi (24).

### Povratni transport holesterola

Povratni transport holesterola pomaga telesu vzdrževati homeostazo holesterola z odstranjevanjem odvečnega holesterola iz perifernih celic in dovajanjem v jetra za ponovno uporabo ali izločanje (za sintezo žolčnih kislin ali izločanje prostega holesterola v žolč). Večinoma poteka s HDL delci, kar kaže na njihovo antiaterogeno lastnost (3, 25).

Za nastanek zrelih HDL delcev je potrebnih več korakov. Prvi korak vključuje sintezo apo A-1 v črevesju in jetrih. Ko se apo A-1 izloči, se nanj vežejo holesterol in fosfolipidi iz enterocitov in hepatocitov. To vezavo olajša membranski transporter ABCA1 (angl. *ATP-binding cassette transporter A1*). Nastane nascentni HDL delec v obliki diska (26). Z zunajceličnim dodajanjem površinskih komponent se nascentni HDL delci pretvorijo v sferično obliko, ki predsta-

vlja zrelo obliko HDL. Zreli HDL delci lahko pridobivajo dodatni holesterol iz celic s pomočjo membranskega transporterja ABCG1, čistilnih receptorjev SR-B1 (angl. *Scavenger receptor class B type 1*) in s pasivno difuzijo.

Ko se holesterol dostavi v HDL po kateremkoli mehanizmu, se esterificira z delovanjem LCAT. Apo A-I je aktivator LCAT in olajša postopek esterifikacije. Velikost HDL delca je močno odvisna od količine nakopičenih HE in aktivnosti LCAT (27).

HDL delci s HE potujejo v jetra na enega od naslednjih načinov:

- neposredno preko SR-B1, ki iz HDL delca selektivno prevzemajo HE, HDL z manj lipidi pa se vrne v obtok za nadaljnji transport;
- posredno s prenosom holesterola iz HDL v VLDL ali LDL s pomočjo transportnega proteina CETP (angl. *Cholesterol ester transfer protein*) in nato prevzemom preko družine LDLR, ki prepoznajo lipoproteine z apo E oz. apo B kot ligandom (3, 28).

Bolezenske spremembe v genu za transporter ABCA1 povzročijo Tangierjevo bolezen, ki je povezana z nizkimi vrednostmi HDL in vodi v zgodnji nastop srčno-žilne bolezni (29).

## ZAKLJUČEK

Razumevanje molekularnih in genetskih mehanizmov presnove lipoproteinov je osnova za raziskovanje patofiziologije dislipidemij in ima pomembno klinično uporabnost. Razvijajo se nova zdravila, ki se lahko uporabljajo v kombinaciji s statini za nižanje LDL-holesterola in nadaljnje zmanjševanje tveganja za srčno-žilne bolezni (zaviralci NPC1L1, zaviralci MTP, zaviralci PCSK9, zaviralci CETP, zaviralci informacijske RNA za kodiranje apo-B...).

Večje poznavanje presnove lipoproteinov bo v prihodnosti odprlo možnosti za ciljano, posamezniku prilagojeno zdravljenje dislipidemij. »

## LITERATURA

1. Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. Book from MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA); 2015.
2. Sethi AA, Russell Warnick G, Remaley AT. Lipids and lipoproteins. In: Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical Chemistry: Principles, Techniques, and Correlations*. 6th ed. Jones & Bartlett Learning; 2010. p. 328-55.
3. Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(12):1695–727.
4. Kwan BCH, Kronenberg F, Beddhu S and Cheung AK. Lipoprotein Metabolism and Lipid Management in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:1246–61.
5. Kidambi S, Patel SB. Cholesterol and non-cholesterol sterol transporters: ABCG5, ABCG8 and NPC1L1: a review. *Xenobiotica*. 2008;38:1119–39.
6. Hooper AJ, Burnett JR, Watts GF. Contemporary aspects of the biology and therapeutic regulation of the microsomal triglyceride transfer protein. *Circ Res*. 2015;116:193–205.
7. Siddiqi S, Saleem U, Abumrad NA, Davidson NO, Storch J, Siddiqi SA et al. A novel multiprotein complex is required to generate the prechylomicron transport vesicle from intestinal ER. *J Lipid Res*. 2010;51:1918-28.
8. Hussain MM. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25:200–6.
9. Tada H, Okada H, Nomura A, Takamura M and Kawashiri M. Beneficial effect of ezetimibe-atorvastatin combination therapy in patients with a mutation in ABCG5 or ABCG8 gene. *Lipids in Health and Disease*. 2020;19:3.
10. Blom DJ, Raal FJ, Santos RD, Marais AD. Lomitapide and Mipomersen-Inhibiting Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP) and apoB100 Synthesis. *Curr Atheroscler Rep*. 2019;21(12):48.
11. Olivecrona G. Role of lipoprotein lipase in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2016;27:233–241.
12. Williams KJ, Chen K. Recent insights into factors affecting remnant lipoprotein uptake. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21:218–28.
13. Wang H and Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297:271–88.
14. Smelt AHM, de Beer F. Apolipoprotein E and familial dysbetalipoproteinemia: clinical, biochemical, and genetic aspects. *Semin Vasc Med*. 2004;4(3):249-57.
15. Tiwari S, Siddiqi SA. Intracellular trafficking and secretion of VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:1079–86.
16. Narcisi TME, Shoulders CC, Chester SA, Read J, Brett DJ, Harrison GB et al. Mutations of the Microsomal Triglyceride-Transfer-Protein Gene in Abetalipoproteinemia. *Am J Hum Genet*. 1995;57(6):1298–310.
17. Santamarina-Fojo S, González-Navarro H, Freeman L, Wagner E, and Nong Z. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004;24(10):1750-54.
18. Rafeian-Kopaei M; Setorki M; Douidi M; Baradaran A; Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med*. 2014;5:927–46.
19. Rosenson RS, Hegele RA, Fazio S, MD, Cannon CP. The Evolving Future of PCSK9 Inhibitors. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72:314–29.
20. Van de Sluis B, Wijers M, Herz J. News on the molecular regulation and function of hepatic low-density lipoprotein receptor and LDLR-related protein 1. *Curr Opin Lipidol*. 2017;28:241–7.
21. Yamamoto T, Lu C, Ryan RO. A two step binding model of PCSK9 interaction with the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*. 2011;286:5464–70.
22. Awan Z, Baass A, Genest J. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9): Lessons Learned from Patients with Hypercholesterolemia. *Clin Chem*. 2014;60(11):1380–89.
23. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis. *J Clin Invest*. 2002;109:1125–31.
24. Wierzbicki AS, Viljoen A, Hardman TC, Mikhailidis DP. New therapies to reduce low density lipoprotein cholesterol. *Curr Opin Cardiol*. 2013;28:452–7.
25. Wang HH, Garruti G, Liu M, Portincasa P, Wang DQH. Cholesterol and Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis: Recent Advances in Reverse Cholesterol Transport. *Ann Hepatol*. 2017;16(1):27-42.
26. Ji A, Wroblewski JM, Cai L, de Beer MC, Webb NR, van der Westhuyzen DR. Nascent HDL formation in hepatocytes and role of ABCA1, ABCG1 and SR-BI. *J Lipid Res*. 2012;53:446–55.
27. Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of Apo-I, ABCA1, LCAT and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med*. 2006;84:276–94.
28. Zhang L, Yan F, Zhang S, Lei D, Charles MA, Cavigliollo G, et al. Structural basis of transfer between lipoproteins by cholesteryl ester transfer protein. *Nat Chem Biol*. 2012;8:342–9.
29. Oram JF. Tangier disease and ABCA1. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1529(1-3):321-3.

# Prepoznavanje dedno znižane aktivnosti antitrombina – ena metoda za vse?

## *Diagnosis of hereditary decreased antithrombin activity – one method for all?*

Tamara Rojnik<sup>1</sup>, Mojca Božič Mijovski<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za žilne bolezni, Laboratorij za hemostazo in aterotrombozo

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo

Avtor za korespondenco:

**Tamara Rojnik, mag. lab. biomed.**

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za žilne bolezni, Laboratorij za hemostazo in aterotrombozo, Zaloška 7, 1000 Ljubljana, Slovenija,  
e-pošta: tamara.rojnik@kclj.si

### POVZETEK

Dedno znižana aktivnost antitrombina izmed vseh dednih dejavnikov predstavlja največje tveganje za tromboembolični dogodek. Veliko število različic antitrombina zaradi prisotnosti sprememb v genu *SERPINC1* predstavlja izziv za diagnostiko dedno znižane aktivnosti antitrombina, saj se občutljivost metod za merjenje njegove aktivnosti razlikuje glede na posamezne različice AT. Tako postaja pri odkrivanju dedno znižane aktivnosti antitrombina vedno bolj zaželeno uporaba molekularno genetskih metod. Slednje omogočajo enostavnejšo določitev tipa dedno znižane aktivnosti antitrombina ali genetske spremembe, kar lahko vpliva na odločitev o zdravljenju teh bolnikov. Poznavanje genetskega ozadja dedno znižane aktivnosti antitrombina v populaciji je ključno pri oblikovanju optimalnega diagnostičnega algoritma, ki bi vključeval tako metode za merjenje aktivnosti antitrombina kot tudi molekularno genetske metode.

**Ključne besede:** dedno znižana aktivnost antitrombina, različice antitrombina, funkcijske preiskave, molekularno genetske metode

### ABSTRACT

Hereditary decreased antithrombin activity is the most severe type of thrombophilia, since it poses the greatest risk of venous thromboembolism. Large number of antithrombin variants caused by alterations in *SERPINC1* gene make the diagnosis of hereditary decreased antithrombin activity challenging due to different diagnostic sensitivity of antithrombin activity assays to antithrombin variants. Thus, the use of molecular genetic methods in the detection of hereditary decreased antithrombin activity has recently increased as they enable easier determination of the type of hereditary decreased antithrombin activity or specific genetic variant, which may influence the decisions on the therapeutic approach. Information about genetic background of hereditary decreased antithrombin activity in the population is crucial in designing an optimal diagnostic algorithm that would include functional as well as molecular genetic methods.

**Key words:** hereditary decreased antithrombin activity, antithrombin variants, functional methods, molecular genetic methods



## UVOD

Antitrombin (AT) je najpomembnejši endogeni antikoagulant, saj zavira delovanje koagulacijskih faktorjev FXa in trombina (FIIa), ki sta ključni serinski proteazi v končnih stopnjah koagulacijske kaskade (1). Antikoagulacijska aktivnost AT je v prisotnosti heparina oz. heparinu podobnih molekul močno povečana. Zaradi pomembne vloge v hemostazi ne preseneča, da dedno znižana aktivnost AT predstavlja najhujšo obliko dedne trombofilije (tj. povečane nagnjenosti k trombozam), saj povzroči hiperkoagulabilno stanje, ki znatno zveča tveganje za vensko tromboembolijo (VTE). En do pet odstotkov bolnikov z VTE ima dedno znižano aktivnost AT, medtem ko je incidenca v splošni populaciji ocenjena na 0,02–0,2 % (2).

V večini primerov je dedno znižana aktivnost AT posledica zarodne genetske spremembe v genu za AT *SERPINC1*, ki se deduje avtosomno dominantno (3). Trenutno je v Bazi podatkov genskih mutacij človeškega genoma (HGMD, angl. *Human Gene Mutation Database*) opisanih 483 sprememb gena *SERPINC1* (4). Nesmiselne genetske spremembe, genetske spremembe s premikom bralnega okvirja, velike genetske spremembe in genetske spremembe z vplivom na izrezovanje intronov so povezane s kvantitativnim pomanjkanjem AT (tip I), pri katerem pride do zmanjšane nastajanja proteina. Najpogostejše pa so drugačnosmiselne spremembe, ki največkrat povzročijo kvalitativno pomanjkanje AT (tip II), za katerega sta značilni normalna koncentracija in znižana aktivnost proteina v plazmi. Genetske spremembe tipa II lahko: (i) okvarijo aktivni center AT in s tem ovirajo vezavo AT na substrat (genetske spremembe tipa IIRS, angl. *reactive site*), (ii) okvarijo vezavno mesto za heparin (genetske spremembe tipa IIHBS, angl. *heparin binding site*) in s tem oslabijo vezavo heparina, ali pa (iii) vplivajo na oboje (genetske spremembe tipa IIPE, angl. *pleiotropic effect*) (1). Večina genetskih sprememb tipa I se pojavlja le v posameznih družinah, medtem ko so nekatere genetske spremembe tipa II v določenih evropskih populacijah bolj pogoste, kot npr. AT Cambridge II (p.Ala384Ser) na Škotskem in v Španiji, AT Budapest III (p.Leu131Phe) na Madžarskem in AT Basel (p.Pro73Leu) na Finskem, pri čemer zadnji dve veljata za t. i. mutaciji ustanovitelja (angl. *founder mutation*) (2).

Takšna kategorizacija je pomembna, saj se klinična slika med tipi dedno znižane aktivnosti AT razlikuje in je fenotip lahko odvisen od posamezne genetske spremembe celo

znotraj istega tipa dedno znižane aktivnosti AT. Dedno znižana aktivnost AT tipa I prevladuje med simptomatskimi bolniki, saj predstavlja visoko tveganje za VTE. Za dedno znižano aktivnost AT tipa II pa je značilna večja klinična heterogenost. Genetske spremembe tipa IIRS in IIPE so po navadi povezane s hudo obliko bolezni, ki je primerljiva s tipom I. Po drugi strani pa tip IIHBS, ki velja za najpogostejšo obliko dedno znižane aktivnosti AT, predstavlja najmanjše tveganje za VTE, a večje za arterijsko trombozo v primerjavi z drugimi tipi dedno znižane aktivnosti AT. Čeprav homozigotna oblika dedno znižane aktivnosti AT tipa IIHBS ni letalna, pa homozigoti doživijo trombotični dogodek v zgodnejšem obdobju, pogostejši so tudi zapleti v nosečnosti in pojav tromboze na neobičajnih mestih (5–9).

Danes dedno znižano aktivnost AT prepoznavamo s funkcijskimi preiskavami, saj je aktivnost zmanjšana pri obeh tipih dedno znižane aktivnosti AT. Funkcijske preiskave temeljijo na merjenju plazemske aktivnosti AT v prisotnosti heparina posredno preko zaviranja FXa oz. trombina (FIIa), ki ga dodamo v presežku. Po dodatku za FXa ali FIIa specifičnega kromogenega substrata je izmerjena absorbanca obratno sorazmerna aktivnosti AT. O dedno znižani aktivnosti AT govorimo, ko je aktivnost približno 70 % aktivnosti AT pri zdravi odrasli populaciji ali nižja (2). Na voljo je več komercialnih različic funkcijske preiskave za spremljanje aktivnosti AT, ki se izvajajo na avtomatiziranih analizatorjih, in se poleg samega encima (FXa ali FIIa) razlikujejo tudi v njegovem izvoru (humani ali goveji), koncentraciji heparina, vrsti kromogenega substrata, redčitvi vzorca, inkubacijskem času in pufru (10). Občutljivost teh metod je za posamezne različice AT različna (11–16), kar otežuje diagnostiko dedno znižane aktivnosti AT in zaradi neustrezne obravnave lahko vodi do večjega tveganja za nastanek ali ponovitev VTE. Metode za merjenje aktivnosti AT preko FIIa naj bi bile občutljivejše na različice AT tipa IIRS, medtem ko naj bi bile nekatere metode za merjenje aktivnosti preko FIIa oz. FXa bolj uspešne kot druge pri odkrivanju dedno znižane aktivnosti tipa IIHBS, odvisno od posamezne genetske spremembe (2).

Zaradi številnih različic AT optimizacija ene funkcijske metode za vse različice AT v praksi ni možna. Zato se je vpeljava molekularno genetskih metod v diagnostiko dedno znižane aktivnosti AT zdela primerna rešitev za iz- »



boljšanje občutljivosti njenega odkrivanja. Poleg tega lahko klinično sliko bolje predvidimo na podlagi genotipa v primerjavi z izmerjeno aktivnostjo AT, saj ta ne sovпада vedno s tveganjem za VTE. Vendar pa tudi z molekularno genetskimi metodami ne moremo odkriti vseh bolnikov z dedno znižano aktivnostjo AT, bodisi zaradi omejitev molekularno genetskih metod, bodisi zaradi tega, ker so v znižano aktivnost AT vpleteni še drugi geni (1). Tako se je

pojaval predlog o vpeljavi algoritma za odkrivanje dedno znižane aktivnosti AT, ki vključuje funkcijske, imunske in molekularno genetske metode (1, 3, 17). Ta algoritem bi omogočal zanesljivo prepoznavanje bolnikov z dedno znižano aktivnostjo AT in opredelitev njenega tipa oz. genetske spremembe, s čimer odpira vrata za bolniku prilagojeno laboratorijsko medicino na tem področju.

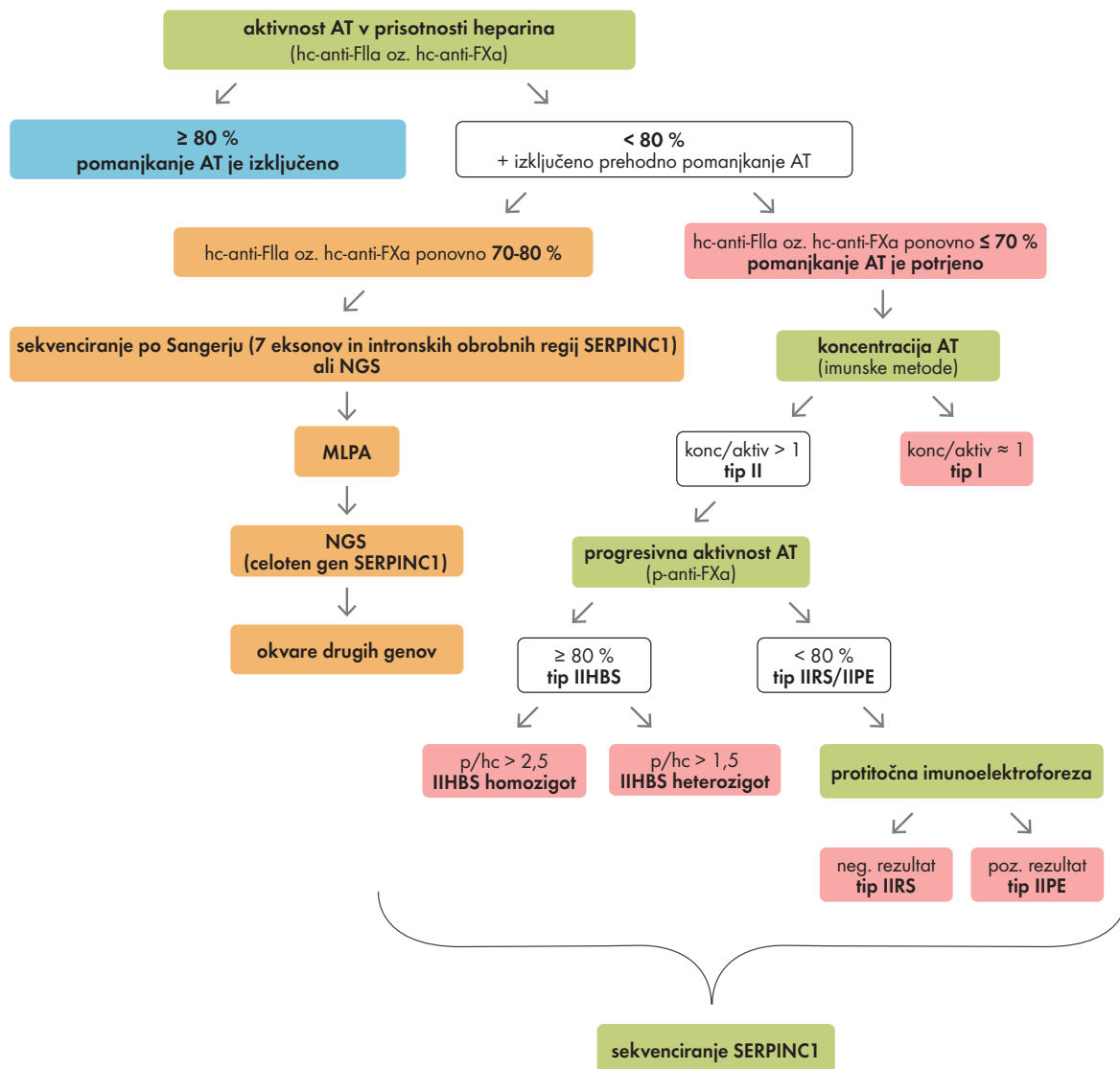
## PREDLOG ALGORITMA ZA ODKRIVANJE DEDNO ZNIŽANE AKTIVNOSTI ANTITROMBINA

V okviru predlaganega algoritma (Slika 1) je najprej treba ugotoviti, ali je aktivnost AT dedno znižana. Ta je potrjena, ko z eno od funkcijskih metod izmerimo znižano aktivnost AT v dveh časovno ločeno odvzetih vzorcih krvi. Sledi opredelitev tipa dedno znižane aktivnosti AT na podlagi razmerja med koncentracijo in aktivnostjo AT. Pri tipu I je razmerje blizu 1, pri tipu II pa nad 1. V primeru tipa II sledi določitev progresivne aktivnosti AT, pri kateri merimo aktivnost AT v odsotnosti heparina ob daljšem inkubacijskem času, s čimer lahko odkrijemo nosilce genetske spremembe tipa IIHBS, ki imajo z izjemo homozigotov in nekaterih genetskih sprememb (npr. AT Budapest III) najmanjše tveganje za VTE v primerjavi z nosilci drugih tipov genetskih sprememb (1, 3, 17). Pri nosilcih genetske spremembe tipa IIHBS je progresivna aktivnost AT normalna za razliko od nosilcev ostalih tipov dedno znižane aktivnosti AT, zato je razmerje med progresivno aktivnostjo AT in aktivnostjo AT v prisotnosti heparina pri nosilcih genetske spremembe tipa IIHBS povišano, najvišje je pri homozigotih (18). S protitočno imunoelektroforezo lahko ločimo med oblikami AT z visoko in nizko afiniteto do heparina in je tako primerna za razlikovanje med nosilci genetske spremembe tipa IIRS in IIPE, kjer normalna afiniteta do heparina kaže genetsko spremembo tipa IIRS. Ta metoda se danes uporablja skoraj izključno v raziskovalne namene, saj se tveganje za VTE z izjemo nekaterih genetskih sprememb (npr. AT Cambridge II) med opisanima tipoma dedno znižane aktivnosti AT ne razlikuje bistveno (1, 3, 17). Za določitev specifične genetske spremembe je treba določiti nukleotidno zaporedje gena *SERPINC1*. Kadar analize kažejo prisotnost genetske spremembe tipa I, je potrebna določitev nukleotidnega za-

poredja celotnega gena, saj se genetske spremembe tipa I lahko pojavljajo na različnih mestih v genu. Po drugi strani pa lahko genetske spremembe tipa II iščemo bolj ciljano. Genetske spremembe tipa IIHBS se po navadi nahajajo na eksonu 2 in 3, medtem ko spremembe tipa IIRS in IIPE najdemo na eksonu 7 (19). V primeru mejne aktivnosti AT (70–80 %) in kadar na podlagi klinične slike bolnika pomislimo na dedno znižano aktivnosti AT, je priporočljivo sekvenciranje po Sangerju vseh sedmih eksonov in intronskih obrobnihih regij ali pa določitev nukleotidnega zaporedja z uporabo metod sekvenciranja nove generacije (NGS). Pomanjkljivost trenutnih metod sekvenciranja je težavno odkrivanje večjih genetskih sprememb (npr. duplikacija celotnega eksona, delecija introna). Zato lahko v primeru negativnega rezultata s sekvenciranjem uporabimo metodo MLPA (angl. *Multiple Ligand Probe Amplification*), ki omogoča odkritje dodatnih 2–5 % primerov z dedno znižano aktivnostjo AT, ki imajo eno od poznanih večjih genetskih sprememb *SERPINC1*. S sekvenciranjem celotnega gena lahko odkrijemo nekaj dodatnih genetskih sprememb v regulatornih sekvencah (npr. v promotorju). Glede na ocene bi lahko opisani algoritem pomagal odkriti bolnike z dedno znižano aktivnostjo AT v približno 85 %. Dedno znižana aktivnost AT je namreč lahko tudi posledica okvar drugih genov, ki sodelujejo pri prepisovanju gena *SERPINC1*, epigenetski regulaciji, zvišanju proteina, posttranslacijskih modifikacijah ali odstranjevanju AT iz sistema. Pri petih odstotkih ljudi z dedno znižano aktivnostjo AT lahko najdemo genetske spremembe v genih, ki kodirajo proteine, pomembne za N-glikozilacijo AT (1, 3, 17).

»

Slika 1: Diagnostični algoritem odkrivanja dedno znižane aktivnosti AT (povzeto po (1, 3, 17)).  
 Figure 1: Diagnostic algorithm for hereditary decreased AT activity (summarized from (1, 3, 17)).



*hc-anti-FIIa*, preiskava za merjenje aktivnosti antitrombina v prisotnosti heparina, ki temelji na zaviranju trombina (angl. *Heparin cofactor antithrombin assay based on thrombin inhibition*);

*hc-anti-FXa*, preiskava za merjenje aktivnosti antitrombina v prisotnosti heparina, ki temelji na zaviranju FXa (angl. *Heparin cofactor AT assay based on FXa inhibition*);

*p-anti-FXa*, preiskava za določitev progresivne aktivnosti antitrombina (angl. *progressive antithrombin activity assay*);

*MLPA*, od ligacije odvisno hkratno pomnoževanje sond (angl. *Multiple Ligand Probe Amplification*);

*NGS*, sekvenciranje nove generacije (angl. *Next-generation sequencing*);

*konc/aktiv*, razmerje med koncentracijo in aktivnostjo antitrombina, določeno s preiskavo za merjenje aktivnosti antitrombina v prisotnosti heparina;

*p/hc*, razmerje med progresivno aktivnostjo antitrombina in aktivnostjo antitrombina v prisotnosti heparina »



## RAZPRAVA

Odkrivanje dedno znižane aktivnosti AT v Sloveniji izvajajo le v nekaterih specializiranih diagnostičnih laboratorijih, kjer uporabljajo eno izmed komercialnih funkcijskih preiskav. Glede na nova spoznanja o dedno znižani aktivnosti AT ugotavljamo, da s trenutnim diagnostičnim pristopom ne moremo prepoznati vseh bolnikov. Z razvojem tehnologije in večjo cenovno dostopnostjo genetskih preiskav bi morda ta vidik diagnostike lahko izboljšali. V prispevku predlagamo uporabo algoritma, ki vključuje tako funkcijske kot genetske preiskave. Njegovo uporabnost bo treba preizkusiti v klinični praksi in tako ugotoviti, koliko dodatnih bolnikov z dedno znižano aktivnostjo AT lahko na ta način še prepoznamo. Oceniti bo treba tudi stroškovno učinkovitost takega algoritma, ki se lahko zaradi vključitve velikega števila različnih metod pomembno poslabša. Po mnenju nekaterih strokovnjakov bi morala diagnostika dedno znižane aktivnosti AT sloneti na molekularno genetskih metodah (17). Te so trenutno na voljo le v specializiranih laboratorijih in so namenjene predvsem potrditvi dedno znižane aktivnosti AT. V klinični praksi se genska analiza še ne uporablja zaradi velike razpršenosti možnih mest genetskih sprememb, kar zahteva sekvenciranje celotnega gena, vendar pa sekvenciranje postaja vedno bolj cenovno ugodno. Glavna prednost molekularno genetskih metod pred funkcijskimi je, da omogočajo odkritje patoloških različic AT, ki jih s funkcijskimi preiskavami ne moremo zanesljivo odkriti, bodisi ker so slabše občutljive (kot je to v primeru AT Cambridge II in AT Budapest III) bodisi se patogeni značaj genetske spremembe izrazi samo v določenih okoliščinah, kot je npr. povišana telesna temperatura in nosečnost (AT Dublin, AT Wibble, AT Rouen VI) (2). Čeprav izmerjena aktivnost AT praviloma korelira s tveganjem za VTE (20), pa ravno zaradi slabše občutljivosti funkcijskih metod na določene genetske spremembe AT obstajajo izjeme (11–16). Samo z molekularno genetskimi metodami lahko določimo specifično genetsko spremembo in z gotovostjo odkrijemo homozigotne oblike pomanjkanja. Nenazadnje sekvenciranje za razliko od funkcijskih preiskav omogoča analizo v času akutne faze in antikoagulantnega zdravljenja.

Kljub obetavnosti molekularno genetskih metod se moramo zavedati njihovih pomanjklivosti: zahtevajo drago opremo, posebej usposobljen kader in, kar je najpomembnejše, pri določenem odstotku bolnikov z dedno zmanjšano aktivnostjo AT ne odkrijejo nobene genetske spremembe v *SERPINC1*. Delno so za to krive omejitve metod sekvenciranja pri odkrivanju večjih genetskih sprememb. Po drugi strani pa dedno znižana aktivnost AT ni vedno monogenetska bolezen, saj so v znižano aktivnost AT lahko vpleteni še drugi geni (1). Njihov vpliv na aktivnost AT pa uspešno odkrijemo s funkcijskimi preiskavami. Funkcijske preiskave so prav tako nepogrešljive v kliničnih laboratorijih pri spremljanju zdravljenja z zaviralci FXa in odkrivanju prehodno znižane aktivnosti AT.

Menimo, da so tako molekularno genetske kot funkcijske metode pomembne pri odkrivanju dedno znižane aktivnosti AT. Vendar pa bi bilo pri oblikovanju stroškovno najučinkovitejšega diagnostičnega algoritma njihovo uporabo smiselno prilagoditi genetskemu ozadju populacije, saj se zastopanost določenih genetskih sprememb glede na geografsko območje razlikuje (7, 9, 11, 13, 14).

Določitev tipa dedno znižane aktivnosti AT ali genetske spremembe bi lahko služila kot osnova za bolniku prilagojeno zdravljenje, saj bi na podlagi genetske spremembe lahko bolje napovedali potek bolezni in prilagodili zdravljenje. Navedene ugotovitve in predlogi sicer temeljijo na rezultatih kohortnih raziskav, v katerih so primerjali klinične slike med posameznimi tipi dedno znižane aktivnosti AT (5–9). Zato bi za potrditev povezave med tipom dedno znižane aktivnosti AT ali genetsko spremembo in pogostostjo trombotičnih dogodkov bile potrebne velike multicentrične študije. Na podlagi izsledkov bi nato lahko sklepali o potrebnosti antikoagulantnega zdravljenja pri bolnikih z določenim tipom dedno znižane aktivnosti AT. Tip dedno znižane aktivnosti AT bi tako lahko vključili med ostale dejavnike, kot je vrsta trombotičnega dogodka (sprožen/neprožen), družinska anamneza in zdravstveno stanje ter želje bolnika, na podlagi katerih trenutno temelji odločitev o vrsti in trajanju zdravljenja. »

## ZAKLJUČEK

Diagnostični pristop za odkrivanje dedno znižane aktivnosti AT je v trenutni klinični praksi pomanjkljiv. Pričakuje mo, da bomo s pomočjo kombinacije funkcijskih in genet-

skih preiskav prepoznali pomembno več bolnikov, in da bodo le-ti s poznavanjem genetskega ozadja svoje bolezni lahko ustreznejše zdravstveno obravnavani.

## LITERATURA

1. Corral J, de la Morena-Barrio ME, Vicente V. The genetics of antithrombin. *Thromb Res.* 2018;169:23-9.
2. Van Cott EM, Orlando C, Moore GW, Cooper PC, Meijer P, Marlar R. Recommendations for clinical laboratory testing for antithrombin deficiency; Communication from the SSC of the ISTH. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2020; 18(1): 17-22.
3. Bravo-Perez C, Vicente V, Corral J. Management of antithrombin deficiency: an update for clinicians. *Expert Rev Hematol.* 2019;12(6):397-405.
4. The Human Gene Mutation Database. Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=SERPINC>
5. Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Hugon-Rodin J, Picard V, Horellou MH, Thrombophilia GsgoG. Thrombotic risk according to SERPINC1 genotype in a large cohort of subjects with antithrombin inherited deficiency. *Thromb Haemost.* 2017;117(6):1040-51.
6. Luxembourg B, Pavlova A, Geisen C, Spannagl M, Bergmann F, Krause M, et al. Impact of the type of SERPINC1 mutation and subtype of antithrombin deficiency on the thrombotic phenotype in hereditary antithrombin deficiency. *Thromb Haemost.* 2014;111(2):249-57.
7. Castaldo G, Cerbone AM, Guida A, Tandurella I, Ingino R, Tufano A, et al. Molecular analysis and genotype-phenotype correlation in patients with antithrombin deficiency from Southern Italy. *Thromb Haemost.* 2012;107(4):673-80.
8. Croles FN, Borjas-Howard J, Nasserinejad K, Leebeck FWG, Meijer K. Risk of Venous Thrombosis in Antithrombin Deficiency: A Systematic Review and Bayesian Meta-analysis. *Semin Thromb Hemost.* 2018;44(4):315-26.
9. Gindele R, Selmeczi A, Olah Z, Ilonczai P, Pfliegler G, Marjan E, et al. Clinical and laboratory characteristics of antithrombin deficiencies: A large cohort study from a single diagnostic center. *Thromb Res.* 2017;160:119-28.
10. Berczky Z, Gindele R, Speker M, Kallai J. Deficiencies of the Natural Anticoagulants - Novel Clinical Laboratory Aspects of Thrombophilia Testing. *EJIFCC.* 2016;27(2):130-46.
11. Puurunen M, Salo P, Engelbarth S, Javela K, Perola M. Type II antithrombin deficiency caused by a founder mutation Pro73Leu in the Finnish population: clinical picture. *J Thromb Haemost.* 2013;11(10):1844-9.
12. Sanchez C, Alessi MC, Saut N, Aillaud MF, Morange PE. Relation between the antithrombin Cambridge II mutation, the risk of venous thrombosis, and the endogenous thrombin generation. *J Thromb Haemost.* 2008;6(11):1975-7.
13. Navarro-Fernandez J, de la Morena-Barrio ME, Padilla J, Minano A, Bohdan N, Aguila S, et al. Antithrombin Dublin (p.Val30Glu): a relatively common variant with moderate thrombosis risk of causing transient antithrombin deficiency. *Thromb Haemost.* 2016;116(1):146-54.
14. Orlando C, Heylen O, Lissens W, Jochmans K. Antithrombin heparin binding site deficiency: A challenging diagnosis of a not so benign thrombophilia. *Thromb Res.* 2015;135(6):1179-85.
15. Javela K, Engelbarth S, Hiltunen L, Mustonen P, Puurunen M. Great discrepancy in antithrombin activity measured using five commercially available functional assays. *Thromb Res.* 2013;132(1):132-7.
16. Kovacs B, Berczky Z, Olah Z, Gindele R, Kerenyi A, Selmeczi A, et al. The superiority of anti-FXa assay over anti-FIIa assay in detecting heparin-binding site antithrombin deficiency. *Am J Clin Pathol.* 2013;140(5):675-9.
17. Bravo-Pérez C, De la Morena-Barrio ME, Vicente V, Corral J. Antithrombin deficiency as a still underdiagnosed thrombophilia: a primer for internists. *Pol Arch Intern Med.* 2020; 130(10):868-877.
18. Kovacs B, Berczky Z, Selmeczi A, Gindele R, Olah Z, Kerenyi A, et al. Progressive chromogenic anti-factor Xa assay and its use in the classification of antithrombin deficiencies. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(12):1797-806.
19. Cooper PC, Coath F, Daly ME, Makris M. The phenotypic and genetic assessment of antithrombin deficiency. *Int J Lab Hematol.* 2011;33(3):227-37.
20. Sokol J, Timp JF, Le Cessie S, Van Hylckama-Vlieg A, Rosendaal FR, Kubisz P, et al. Mild antithrombin deficiency and risk of recurrent venous thromboembolism: results from the MEGA follow-up study. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* 2018; 16(4): 680-8.

# Vloga proteomike v bolniku prilagojeni laboratorijski medicini

## *The role of proteomics in personalized laboratory medicine*

### **Borut Božič**

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo  
Univerzitetni klinični center, SPS Interna klinika, Klinični oddelek za revmatologijo

*Avtor za korespondenco:*

**Prof. dr. Borut Božič, mag. farm., EuSpLM**

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana,  
e-pošta: borut.bozic@ffa.uni-lj.si

### **POVZETEK**

Proteomika je v zadnjih letih zaradi uporabe masne spektrometrije izjemno napredovala. Sklopljenost z zmogljivimi afinitetno osnovanimi tehnologijami omogoča izboljšanje klinične uporabe proteinskih bioloških označevalcev. Toda standardizacija proteomskih pristopov je zahtevna in zato izraba proteomike v translacijskih raziskavah in personalizirani medicini še ni polno izkoriščena. Dejstvo, da je proteomika vmesni člen med genotipom in fenotipom, pa odpira nekatere specifične etične zadrege in izzive v laboratorijski medicini.

**Ključne besede:** proteomika, proteini, biooznačevalci, omike, laboratorijska medicina, etika

### **ABSTRACT**

Over the past years, the technology of mass spectrometry-based proteomics has dramatically improved. Coupling with high-throughput affinity-based technologies will improve clinical utility of protein biomarkers. However, it is difficult to standardize proteomic approaches and potential of proteomics in translational research and precision medicine is yet to be fully exploited. The fact that proteomics represents a level between the genotype and the phenotype opens some specific ethical dilemmas and challenges for laboratory medicine.

**Key words:** proteomics, proteins, biomarkers, omics, laboratory medicine, ethics

## UVOD – PROTEINSKA ANALITIKA IN PROTEOMIKA

Skupni namen raziskav molekularne biologije je določitev funkcije genov in proteinov ter jih povezati v poti in mreže, ki naj bi dokončno podale poglobljeno razumevanje delovanja biološkega sistema. Proteomika je veda, ki jo razumemo v dveh dimenzijah: v ožjem pomenu besede je veda, ki se ukvarja z analizo vseh proteinov, torej proteoma, posamezne biološke enote – celice, tkiva, organizma. Ker ne poznamo vseh proteinov, dobimo uporabne informacije s primerjavo rezultatov analiz v dveh stanjih, npr. celice pred aktivacijo in po aktivaciji; ali tumorsko in okoliško zdravo tkivo. V širšem pomenu pomeni proteomika analizo kompleksnih proteinskih vzorcev. Vidika si nista toliko različna, kot je videti na prvi pogled, saj tudi v klasičnem pomenu iz razlik v analizi celotnega proteoma v dveh stanjih nadaljujemo z analizo razlik v manj kompleksnih vzorcih do identifikacije in proučevanja posameznega proteina in njegove vloge (Slika 1).

S tega zornega kota proteomika za klinično biokemijo ni nova. Opisani pristop je bil uporabljan mnogo prej, kot pa se je pojavil pojem proteomika. Ločevanja vseh proteinov v serumu, torej proteoma frakcije krvi kot tekočega tkiva, se je lotil že Tiselius v začetku prejšnjega stoletja. Za razvoj elektroforeze serumskih proteinov je prejel leta 1948 Nobelovo nagrado za kemijo (1).

Proteom je kompleksen in dinamičen pojem, ki ga lahko opredelimo z vidika različnih značilnosti proteinov: njihovega zaporedja, strukture, lokalizacije, modifikacij, interakcij in biokemijskih funkcij. Pri tem dobimo bogat in raznolik nabor podatkov. Analize, ki se tičejo teh različnih lastnosti proteoma, zahtevajo enako raznolik obseg tehnologij. Pri tem ne gre toliko za drugačne analize principe od že poznanih v klasični analitiki proteinov. Še vedno je potovanje nabitih delcev v električnem ali magnetnem polju ključni fizikalni princip proteomike (2, 3). Pomembni pa so pristopi, ki omogočajo obsežne analize v kratkem času in hkrati omogočajo zanesljivost obdelave obilice podatkov. Ne razpolagamo s posamično tehnologijo, s katero bi naenkrat obvladovali pripravo velikega števila vzorcev in njihovo prepustnost skozi procese, poglobljene analize, kratek časovni obrat, bioinformacijska orodja za obdelavo podatkov in identifikacijo posttranslacijskih variant proteinov (4). V ospredju sta dve skupini analiznih metod, ki ju uporabljamo ločeno ali pa povezano: afinitetno osnovane metode in masna spektrometrija.

**Imunokemijske metode afinitetne vezave** so v analitiki proteinov prisotne že dolgo. Teoretične osnove vezave liganda segajo v sredino 20. stoletja (pregled v 5), vendar so šele visoko zmogljive tehnike hkratnega določanja večjega števila merjencev omogočile učinkovito proteomsko analizo. V uporabi sta dva pristopa, oba na voljo tudi v komercialnih izvedbah. Proteinske mikromreže predstavljajo miniaturizacijo principa encimsko imunske metode na trdnem nosilcu, vendar s povečanim številom hkrati določenih reakcij. Izvedbeno so proteinske mikromreže lahko protitelesne (na plošči so protitelesa kot lovilne molekule), funkcijske (na plošči so prečiščeni proteini ali druge molekule za iskanje interakcij) ali reverznofazne (na plošči so vsi proteini tkiva ali celice). Nizkogostotne mikromreže zajemajo od nekaj do nekaj sto proteinov in so zaradi večje ponovljivosti rezultatov uporabljane v kliničnem okolju. Visokogostotne mikromreže zajemajo tudi preko tisoč molekul in so pretežno uporabljene v raziskavah (6). Čeprav so tudi mikromreže v osnovi metode multipleks (večkranost, pri čemer je mišljeno hkratno analiziranje večjega števila vzorcev), se slednji izraz pogosteje uporablja za tehnologijo vezave lovilnih molekul (npr. protiteles) na zrnih v suspenziji (4). Posebno pozornost vzbuja metoda bližnjega podaljševanja ali ligacije (PEA, proximity extension/ligation assay) z enoverižno DNA označenimi protitelesi, ki se hibridizirajo po vezavi protiteles na tarčne proteine. Odkrivanje poteka s pomočjo verižne reakcije s polimerazo ali s sekvenciranjem nove generacije (7, 8).

**Masna spektrometrija (MS)** je v zadnjih desetletjih postala izjemno uporabna tudi na področju proteomike, še posebej za peptidno/proteinsko identifikacijo. Osnovni princip obsega tri korake: Najprej iskane molekule (v proteomiki so to zaporedno specifično cepljeni peptidi) ioniziramo s pomočjo električnega polja, toplote ali z obstreljevanjem z elektroni, fotoni, ioni. Zaradi občutljivosti peptidov je v pomoč lahko tudi matriks, v katerega vnesemo vzorec (matriksno podprta laserska desorpcija/ionizacija). Naslednji korak je ločitev ionov na osnovi razmerij med njihovo maso in nabojem. Končni korak je kvalitativna ali kvantitativna določitev ionov, pri čemer si pomagamo z bioinformacijskimi orodji in bazami podatkov. Je pa za uporabne rezultate potrebna kompleksna predanalizna priprava vzorcev. Tudi zato je masna spektrometrija najpogosteje končni del sklopljenih laboratorijskih orodij, na primer s tekočinsko kromatografijo (9).

Tako pri vseobsežnih afinitetnih analizah kot pri masni spektrometriji pa se bolj kot v klasičnih analizah biološkega materiala soočamo s teoretičnimi vprašanji, kaj pomeni signal (10) – prisotnost molekule, ki jo iščemo, pri-

sotnost podobne molekule, šum v detekcijskem sistemu ali kaj četrtega? V izhodišču sicer teoretična vprašanja postanejo zelo stvarna ob prenosu raziskovalnih odkritij v klinično uporabo (11).

## PROTEOMIKA V LABORATORIJSKI MEDICINI

Proteomika je v vzponu preboja v široko uporabo v laboratorijski medicini. Zato prepoznavamo dva tipa študij, ki se razlikujeta tako v pristopu kot v neposredni prenosljivosti v klinično laboratorijsko prakso: z rezultati vodene raziskave (angl. discovery science/research) (12) in hipotezno vodene raziskave (angl. targeted science/research) (13, 14).

Pogosto je v proteomiki najprej uporabljen z rezultati vodene raziskovalni pristop ali pristop hipotezno nevezanih odkritij (angl. hypothesis-free). S takimi študijami pridobivamo nova znanja in vedenja o delovanju živega sveta. Klasična oblika tega pristopa je analiza celotnega proteoma celice ali tkiva v dveh stanjih: bolna/zdrava, stimulirana/nestimulirana. Proteine z zaporedno specifičnimi encimi razgradimo v peptide, jih ločimo z reverznofazno tekočinsko kromatografijo, frakcije ioniziramo in usmerimo v masni spektrometer. Peptidne mase in obilje peptidov merimo z masnim spektrometrom v celem spektru in se osredotočimo na razlike. Nadaljnja fragmentacija omogoča masne spektre za peptidno identifikacijo, ki poteka s pomočjo informacijskih orodij iskanja po bazah podatkov (primerjalni pregled v 13).

Drug pristop je hipotezno vodena študija, ki je lahko samostojna, lahko pa nadaljevanje z rezultati vodene študije, saj nas zanimajo razlike v dveh stanjih celice ali tkiva. Imenovana je tudi tarčna proteomika. Razmeroma majhno število proteinov, ki so pokazali razlike v pojavljanju v dveh stanjih, testiramo v večji neodvisni skupini. Ker za neznane proteine niso na voljo sicer pogosto uporabljene imunokemijske afinitetne metode za identifikacijo (monoklonska protitelesa), uporabljamo metode tarčne masne spektrometrije.

V laboratorijski medicini je preiskava krvi zagotovo najpogostejši laboratorijski diagnostični postopek, pri čemer so biološki označevalci krvi in krvnih derivatov glavna podpora opredelitvi pacienta, diagnostiki in terapiji. Proteine, ki sestavljajo proteom plazme ali seruma, lahko razvrstimo v tri velike skupine. V prvi skupini so obilno zastopa-

ni proteini (v koncentracijskem razponu  $10E4$  do  $10E11$  ng/L), ki so funkcijsko prisotni v plazmi: albumin, apolipoproteini, proteini akutne faze, koagulacijski faktorji. V drugi skupini so iz celic sproščeni proteini ( $10E2$  do  $10E5$  ng/L): aminotransferaze, tkivno-specifične izooblike proteinov. V tretji skupini so signalni peptidi in proteini, ki so v stabilnih stanjih v koncentracijah pod  $10E3$  ng/L: inzulin, interleukini, rastni faktorji (14). Ker je krvna plazma v neposrednem ali posrednem stiku z vsemi organi v telesu, je s svojo sestavo neizmeren vir informacij. Da te informacije, torej merjence, lahko uporabimo za vrednotenje zdravstvenega stanja posameznika in posledično zdravstveno obravnavo, moramo informacije ovrednotiti – postaviti v okvir zdravja in bolezni, osebne in časovne variabilnosti. To velja tudi za proteine v plazmi. Seveda pa moramo najprej vedeti, kateri proteini so prisotni in v kakšnih oblikah. Prav to je bil namen projekta humani proteom plazme, ki ga je sprožila Organizacija človeškega proteoma (HUPO Human Proteom Organization) leta 2002 in je do leta 2021 v obliko peptidnega atlasa vnesel preko 5800 proteinov (4). Projekt je še v teku, je pa HUPO leta 2010 razširila delovanje v okviru globalnega projekta človeškega proteoma (Human Proteom Project) z dvema namenoma: a/ sestaviti zanesljiv seznam delov človeškega proteoma v vsej njegovi zapletenosti, vključno s posttranslacijskimi spremembami, izrezovalnimi variantami in funkcijami, in b/ umestiti proteomiko kot integralni del "multiomskih" študij za izboljšanje znanj o živem svetu, biomedicine in na bolnika osredotočene medicine (15). Za doseg ambicioznega načrta so delo organizirali v 4 stebre: za tehnološke pristope MS, za protitelesa, za patološke vidike in za podatkovne baze.

Osnovna težava masovne in veliko-obsežne proteinske analitike je izjemen razpon med številom molekul različnih proteinov v vzorcu, ki ga analiziramo. Posebnost takih meritev je pogojenost z verjetnostmi in posledično statističnim pristopom vrednotenja – tudi opredelitev meje zanesljivih signalov. V plazmi, na primer, pride na vsako molekulo interleukina 6 deset milijard molekul albumina. »



Če nam orodje omogoča 1% selektivnost ali razlikovanje med šumom in signalom v razmerju 1:100, pomeni, da ob določanju proteinov iz druge skupine ne prepoznamo nobenega iz tretje. Pri tem ni zanemarljivo, kateri pristop je uporabljen v primarni meritvi – pristop merilnega odstopanja od resnične vrednosti ali pristop merilne negotovosti (10). To je pomembno iz vsaj dveh razlogov. Prvič, podobno kot v industriji tudi v laboratorijski medicini vedno več analiz sloni na enkratni meritvi in ne na računanju srednje vrednosti z odstopanjem množice meritev. Drugič, kot pri vseh masovnih meritvah je tudi v proteomiki pomembna opredelitev verjetnostne meje deleža lažno zaznanih signalov, v tem primeru peptidov.

Ob možnostih, ki nam jih ponuja proteomika na polju novih molekularnih bioznačevalcev in modifikacijskih profilov, je potrebno vzporedno razvijati in uveljavljati tudi ustrezno validacijo teh označevalcev. To vključuje več ravni, ki so zajete v študiji učinkovitosti *in vitro* medicinskega pripomočka (16). Zajemajo preverjanje značilnosti analiznega postopka ter klinične značilnosti rezultatov (Preglednica 1). Zaradi kompleksnosti analiznega postopka lahko pričakujemo, da bodo nekatera vrednotenja rezultatov vezana na izvedbo sklopljenih metod, s katero bodo pridobljeni – podobno kot pri klasičnih imunokemijskih metodah ob uporabi protiteles. Poleg teh dveh standardnih vrednotenj v laboratorijski medicini moramo že ob oblikovanju študije odkrivanja in potrjevanja molekularnih bioloških označevalcev razmišljati o predanaliznih vplivih.

## Tehnično logistični izzivi na področju previda proteomike v laboratorijsko prakso

Uvajanje proteomike v klinično prakso poteka pogosto neposredno iz raziskav, zato se je nujno soočiti z nekaterimi posebnostmi že v zgodnjih fazah. V kliničnih študijah je osnovno vprašanje vezano na zdravstveno stanje pacienta, v globalnih nehipoteznih raziskavah pa sledimo znanstvenemu vprašanju (Preglednica 1). Zato pristopi v reševanju zapletov ali preseganju težav niso in ne morejo biti enaki. Izzivi se pojavljajo v vseh klasičnih fazah laboratorijskega dela: predanalizni, analizni in poanalizni.

V **predanalizni fazi** je pomembna priprava vzorcev. V laboratorijski diagnostiki pričakujemo, da je analizirani vzorec odraz stanja pacienta, zato nekatere rešitve, ki jih uporabljamo v raziskovalne namene, ne pridejo v poštev. Tu je mišljeno predvsem združevanje vzorcev za dosega-

nje zadostne količine pičlo zastopanih proteinov.

Način shranjevanja vzorcev pred obdelavo in analizo je v proteomiki izjemno pomemben, kar še posebno velja, če uporabljamo v nadaljevanju afinitetne imunokemijske metode. Za proteinske analize po nekajmesečnem shranjevanju so potrebne temperature shranjevanja pod  $-80^{\circ}$  Celzija (17). Vprašanje velikega koncentracijskega razpona proteinov v vzorcu (še posebej v plazmi) rešujemo z različnimi pristopi (pregled v 14). Najpogostejša je deplecija 6-20 najbolj zastopanih proteinov (18), kar nam omogoči prepoznavanje 500-800 plazemskih proteinov z MS, skloppljeno s tekočinsko kromatografijo. Obilno prisotne proteine učinkovito odstranimo v afinitetnih kolonah s specifičnimi protitelesi. Obstaja seveda nevarnost, da izgubimo tudi del manj zastopanih proteinov s podobnimi strukturnimi elementi, vendar je o tem vprašanju na voljo malo kredibilnih podatkov (4).

Obsežna frakcionacija vzorca, združena s skenirajočo MS omogoči detekcijo bistveno večjega števila proteinov, vendar je povezana z višjimi stroški in večjo porabo časa, hkrati pa tudi z manjšim volumnom posamične frakcije analiziranega vzorca. Zaradi več ločenih faz, oziroma ločene obravnave posamezne frakcije, se poveča nezanesljivost in poslabša ponovljivost. So pa na tržišču že integrirani mikrotekočinski pripomočki za avtomatično obdelavo plazme, kar vključuje odstranitev obilnih proteinov, cepitev proteinov in razsoljevanje (98). Vzorec je možno tudi dvojno obdelati, torej odstraniti obilne proteine in ga frakcionirati (4).

V **analizni fazi** se soočamo s pomembnim vprašanjem zagotavljanja kakovosti in zanesljivosti na več ravneh. Miniaturizacija, ki je nujna ob majhnih volumnih vzorcev, predstavlja sama zase izziv od vpliva površinske napetosti, kapilarnega vleka, elektroosmoze, kinetike do vprašanja specifičnosti signala ob verjetni prisotnosti posamične molekule ali le nekaj molekul iskanega merjenca v majhnem volumnu frakcije. Če to povežemo s potrebo po določanju velikega števila proteinov hkrati, se hitro znajdemo v situaciji zmanjšane zanesljivosti rezultatov zaradi navzkrižnih vezav uporabljenih protiteles. Slednje so afinitetno pogojene, vendar zaradi velikega števila tudi nizko afinitetne vezave vplivajo na rezultat (teoretična osnova v 20). V tem pogledu predstavljajo pomemben korak naprej metode bližnjega podaljševanja (PEA), saj močno zmanjša vpliv nizkoafinitetnih navzkrižnih vezav protiteles ob velikem številu reakcij. Ni pa (še) sistematičnih študij natančnosti in točnosti različnih izvedb (4).

»

Masovne in veliko-obsežne proteinske analitike so pogojene z verjetnostmi in opredelitvijo meje zanesljivih signalov. Standard z uporabo masne spektrometrije je 1% lažno določenih molekul (14).

**Poanalizna faza** proteomike je, podobno kot druge “omike”, povezana najprej z obdelavo masovnih podatkov in šele nato z interpretacijo rezultatov in izvid. Čeprav je članek namenjen predvsem laboratorijski medicini, se bomo zaradi lažjega razumevanja dotaknili obeh glavnih vidikov proteomike (13,21,22).

V tarčni proteomiki, ki jo uporabljamo tudi v diagnostiki, analiziramo samo izbrani nabor proteinov, najsi bo to s spremljanjem vzporedno potekajočih reakcij (PRM parallel reaction monitoring) ali s spremljanjem izbranih reakcij (SRM, selected reaction monitoring). V z rezultati vodeni raziskovalni proteomiki želimo pridobiti čim večje število masnih spektrov. Najpogostejši pristop je podatkovno odvisna pridobitev (DDA, data dependent acquisition), pri kateri v prvi fazi (ali masni spekter 1) zaporedoma pridobimo spektre izpranih peptidov, čemur sledi druga faza (ali masni spekter 2) pridobitve fragmentnega spektra avtomatsko izbranih prekursorjskih ionov. Drugi pristop je podatkovno neodvisen (DIA data independent acquisition), ki ne sloni na prekursorjskih ionih v celem masnem obsegu, temveč na sistematično izbranih ožjih oknih prekursorjskih ionov. Znotraj takih oken imamo fragmente vseh peptidnih ionov, kar povzroči večjo ponovljivost DIA v pri-

merjavi z DDA še posebno za pičlo prisotne peptide (13).

**Zagotavljanje kakovosti** predstavlja poseben izziv na področju proteomike. Ker je v analizo praviloma vključenih večje število sklopljenih metod, ki so vsaka zase kompleksne, je nujen sistematičen in poglobljen pristop zagotavljanja kakovosti. Kot v celotni laboratorijski medicini tudi tu slednje ni vezano samo na analizno fazo (pregled v 21). Priprava vzorca se lahko zelo razlikuje glede na uporabljeno skupino metod (afinitetne ali MS), pa tudi znotraj tega. Zato je smiselno preveriti skozi procesogram, kaj vse lahko vpliva v posameznem koraku na variabilnost končne rezultata. V analizni fazi uporabimo kontrolne vzorce, ki so lahko enostavne ali kompleksnejše sestave – ponovno v odvisnosti od uporabljenih analiznih pristopov. Za neodvisno obravnavo posamičnih dejavnikov variabilnosti lahko učinkovito uporabimo Paretove grafe (23), s katerimi si pomagamo podobno kot z Westgardovimi pravili v klasičnih analizah. Projekt človeškega proteoma (15) je že v začetnih fazah pokazal, da je v poanalizni fazi analiz obilice podatkov, kot je na primer MS, bistveno večje število vzrokov neponovljivosti kakor v klasičnih analizah (24). Številna iskalna orodja uporabljajo različne metodologije z vgrajenimi predpostavkami in so praviloma na voljo brez temeljitih primerjalnih študij. Za laboratorijsko medicino je še posebej pomembno dolgoročno spremljanje meritev, pri čemer kaže obetavne rezultate njihova obdelava z multivariantnimi pristopi (21).

## PRIMERI PROTEOMIKE PRI POSAMEZNIH BOLEZENSKIH STANJIH

Prisotnost ali odsotnost posamičnega proteina je le delček sprememb proteoma. Bolezensko stanje lahko vpliva na proteinsko procesiranje, na posttranslacijske modifikacije, na interakcije s proteini in drugimi molekulami ter na lokacijo proteina v biološkem sistemu. In čeprav v laboratorijski medicini proteinske biooznačevalce uporabljamo že stoletje (1), se za proteomski pristop era šele začena. Mnogi raziskav le počasi prodira z validiranimi rezultati v klinično prakso. Poglejmo si stanje na nekaterih področjih.

### Okužbe

Na področju okužb se je proteomika že dobro usidrala v obliki molekularno diagnostičnih mikrobioloških preiskav. To je pogojeno z večjo opredeljenostjo iskanih proteinov, saj ne iščemo posamičnih sprememb v proteomu pacienta, ampak prisotnost mikrobnih proteinov. Matriksno podprta laserska ionizacija/desorpcija s časom preleta ionov (MALDI-TOF) in kvadrupolno masno spektrometrijo je že rutinsko uporabljana v svetu in pri nas (25). »



## Srčno-žilne bolezni

V večini proteomskih študij na tem področju so v zadnjem desetletju uporabljali masno spektrometrijo na tkivih in celicah modelnih sistemov (26). Seveda pa je študijske rezultate treba ustrezno prevesti za klinično rabo, kar je poseben izziv (27). V zadnjem času so obsežno uporabljana afinitetna orodja, npr. aptamerne mikromreže in multipleksni imunokemijski sistemi, kar se že kaže v objavah proteomskih profilov, vezanih na stanja srca in ožilja (28). Primeri proteinskih bioznačevalcev na področju srčno-žilnih bolezni so srčni troponini, strukturni proteini, ki se izražajo v srčnih miocitih, zato imajo v laboratorijski medicini visoko klinično specifičnost za poškodbe srca.

## Nevrodegenerativne bolezni

Nevroproteomski pristopi so se do sedaj odlikovali v raziskavah, ki so prepoznale precej potencialnih diagnostičnih, prognostičnih ali poškodbenih označevalcev, povezanih z nevrodegenerativnimi motnjami. Žal večina študij zaradi omejenosti dostopa in količine cerebrospinalne tekočine sloni na združevanju vzorcev (29), kar je uporabno za

pridobivanje novih spoznanj (z rezultati vodena proteomika), popolnoma neuporabno pa v diagnostiki (tarčna proteomika). Nekaj obetavnih bioznačevalcev Alzheimerjeve bolezni je uporabnih za opredelitev stopnje bolezni, ne pa za njeno odkrivanje. Po drugi strani pa odpirajo integrirani pristopi genomike, transkriptomike, proteomike in lipidomike obetavne možnosti za preverjanje in validacijo potencialnih bioznačevalcev Alzheimerjeve bolezni na večjih skupinah pacientov (30).

## Rakave bolezni

V onkologiji je bil zagotovo na področju proteomskih pristopov narejen največji preboj. Posledice so vidne tako v zgodnji diagnostiki kot v prognozi mnogih rakavih bolezni (31). Zaradi izražanja proteinov iz različnih tkiv organizma v rakavem tkivu je pomembno celovito poznavanje celičnih proteomov, k čemur lahko pripomore tudi nastajajoča proteomska enciklopedija rakavih celičnih linij (32). Tak atlas je temelj za prenos raziskovalnih znanj v diagnostiko. Še vedno pa obstaja odprto pomembno in zahtevno torišče, to je ustrezna standardizacija, kar pa je splošen izziv proteomike.

# ETIČNI VIDIKI UVAJANJA PROTEOMIKE V KLINIČNO PRAKSO

Pridobivanje velikih količin podatkov, ki so nujni v sodobnih pristopih sistemske biologije za personalizirano medicino, odpira tudi vrsto etičnih vprašanj. Slednja so bila za področje genomike in genetskih raziskav že obsežno obravnavana (pregled v 33). Vprašanje je, koliko se sprejeti pristopi v genomiki nanašajo tudi na proteomiko, predvsem z vidika zasebnosti posameznika, predaje iskanih ali neiskanih rezultatov in anonimizacije pri delitvi podatkov v raziskovalni skupnosti. Tudi pri proteomiki moramo ločevati dvojnost pristopov (Preglednica 2). V raziskovalnih študijah je v ospredju raziskovalno vprašanje in odgovornost raziskovalca do udeleženca raziskave, pri čemer se neiskani rezultati praviloma ne izročajo. V laboratorijski medicini pa je v ospredju pacient, odgovornost medicinskega osebja do pacienta. Neiskani podatki se izročajo skladno z medicinsko doktrino "ne škoditi", pri čemer ima pacient tako pravico vedeti, kot tudi pravico ne vede-

ti. Bolj nedorečeno je vprašanje delitve rezultatov znotraj raziskovalne skupnosti. Izmenjava informacij predstavlja ključno osnovo za preglednost delovanja. Je pa tudi nujna za pridobivanje znanj o delovanju bioloških sistemov na splošno, kar je razvidno iz projektov oblikovanja različnih atlasov ali proteinskih/proteomskih seznamov. Plazemski proteom, celotni človeški proteom, proteomi rakavih celic (4, 14, 15, 32) in podobno so osnova za prenos splošnih znanj v laboratorijsko medicino.

Proteomski podatki niso isto kot genomski, saj je variabilnost bistveno večja in prepoznavanje posameznika težje. Tradicionalno gledano proteomski podatki zato ne veljajo za osebno občutljive, kar pa je v zadnjem obdobju deležno razprav. Proteomika daje namreč dvojno občutljive informacije – omogoča prepoznavanje osebe in daje izhodišča o zdravstvenem stanju. Proteomske strategije, ki upora- »

bljajo posamične aminokislinske polimorfizme (SAPs, single amino acid polymorphisms) odpirajo vprašanje, koliko je proteomske podatke sploh mogoče anonimizirati. Glede občutljivosti podatkov daje pristop SRM najmanj osebno občutljive informacije, sledijo mu PRM, DDA in DIA (izčrpen pregled v 34).

Podatki o proteinih, najsi bodo pridobljeni v raziskavah pod pojmom proteomika, transkriptomika, peptidomika,

ali kakšna druga “omika”, dajejo pomembne informacije o fenotipu posameznika, zato se je treba navedenih vprašanj lotevati z veliko mero občutka v smislu “ne škoditi”. V tem kontekstu je pojasnjeni pristanek ključnega pomena tako v laboratorijski medicini kot v raziskovalnem delu, kar izhaja iz etičnega odnosa do vseh udeležencev in iz formalne legislativne (35).

## PERSPEKTIVE PROTEOMIKE V LABORATORIJSKI MEDICINI

Večina današnjih proteinskih biooznačevalcev sodi v skupino obilno zastopanih proteinov plazme ali pa zanje poznamo jasne patofiziološke povezave. Med 300 najobilnejše zastopanimi proteini jih je 23 % že prepoznanih kot biooznačevalci. Če to ekstrapoliramo na celotno skupino obilno zastopanih proteinov v plazmi, lahko samo v tej skupini pričakujemo še preko 200 novih biooznačevalcev. In kaj šele v preostalih dveh skupinah plazemskih proteinov! In upoštevati moramo, da se proteomika razvija na celotnem spektru bioloških vzorcev, vključno z znotrajceličnimi organelami in drugimi tkivi (21).

Ob kakih 20.000 kodiranih proteinih v človeškem genomu in 14.500 klasificiranih boleznih v mednarodni statistični klasifikaciji bolezni in bolezenskih stanj je hitro jasno, da ne moremo pričakovati za vsako bolezensko stanje “svoje-ga” označevalca. Že zdaj je vidno, da posamični bioozna-

čevalci niso (in ne bodo) nujno neposredno vpleteni v patogenezo. Prihodnost ni toliko v posameznem proteinu kot označevalcu posamezne bolezni, temveč bolj v povezavah označevalcev ali profilih, kot jih že poznamo: npr. deRitisov količnik pri jetrnih obolenjih ali Framinganov rizični indeks za koronarno srčno bolezen, ki vsebuje poleg molekularskih tudi druge označevalce. Ker bolezni vplivajo tudi na posttranslacijske spremembe, so na obzorju povezovalne platforme podatkov različnih “omik”, na primer integrirano “omsko” profiliranje (iPOP, integrated personalized omics profiling) (36) ali vzročno usmerjeno raziskovanje “multiomskega” prostora (COSMOS, causal oriented search of multi-omics space) (37).

Očitno bo vloga proteomike v laboratorijski medicini tako kompleksna, kot je kompleksna vloga proteinov v zdravju in boleznih posameznega osebkca.

## LITERATURA

1. Willis MS, Arne Tiselius: *Clinical Chemistry. Laboratory Medicine*, 2009; 40:627–628, <https://doi.org/10.1309/LMKTBKG7YGLD4U0V>.
2. Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of Proteomics*, 2010;73 (11):2064-77. [doi:10.1016/j.jprot.2010.05.016](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.05.016). [ffhal-00509715f](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2009715f/)
3. Omersel J, Gobec M, Božič B. Chromatography / Electrophoresis: Affinity separation techniques. In Worsford P, Poole C, Townshend A, Miro M (Eds.) *Encyclopedia of Analytical Science*, (3rd ed.), Elsevier 2019;2:62-70.
4. Deutsch EW, Omenn GS, Sun Z, Maes M, Pernemalm M, Palaniappan KK et al. Advances and utility of the human plasma proteome. *J Proteom Res* 2021;20:5241-5263; [doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00657](https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00657).
5. Di Cera E. Mechanisms of ligand binding. *Biophysics Rev* 2020; 1, 011303; [doi.org/10.1063/5.0020997](https://doi.org/10.1063/5.0020997).
6. Neagu M, Bostan M, Constantin C. Protein microarray technology: Assisting personalized medicine in oncology (Review). *World Academy of Sciences Journal* 2019;1: 113-124. DOI: 10.3892/wasj.2019.15.
7. Assarson E, Lunberg M, Holmquist G, Bjoerkesten J, Bucht Thorsen S, Ekman D et al. Homogenous 96-Plex PEA Immunoassay Exhibiting High Sensitivity, Specificity, and Excellent Scalability. *PLoS ONE* 2014; 9(4): e95192. [doi:10.1371/journal.pone.0095192](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095192).
8. Zhong W, Edfors F, Gummeson A, Bergstroem G, Fagerberg L, Uhlen M et al. Next generation plasma proteome profiling to monitor health and disease. *Nat Commun* 2021;12(1): 2493. [doi.org/10.1038/s41467-021-22767-z](https://doi.org/10.1038/s41467-021-22767-z).
9. Rozanova S, Barkovits K, Nikolov M, Schmidt C, Urlaub H, Marcus K. Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview. In: Marcus K., Eisenacher M., Sitek B. (eds) *Quantitative Methods in Proteomics. Methods in Molecular Biology*, vol 2228. Humana, New York 2021. ogleđano 25.maja 2022 na naslovu [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-1024-4\\_8](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-1024-4_8).

10. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 2012. ogledano 25. maja 2022 na naslovu [https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM\\_200\\_2012.pdf/f0e1ad45-d337-bbeb-53a6-15fe649d0ff1](https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM_200_2012.pdf/f0e1ad45-d337-bbeb-53a6-15fe649d0ff1).
11. Božič B (urednik), Obreza A (urednik), Marc J (urednik), Lukač-Bajalo J (urednik). Merjenje imunosti - od molekule do bolnika; enodnevno podiplomsko izobraževanje iz laboratorijske biomedicine, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2007.
12. Aebersold R, Hood RE, Watts JD. Equipping scientists for the new biology. *Nature Biotechnology* 2000; 18:359.
13. Gotti C, Roux-Dalva F, Joly-Beuparlant C, Mangnier L, Leclercq M, Droit A. Extensive and Accurate Benchmarking of DIA Acquisition Methods and Software Tools Using a Complex Proteomic Standard. *J. Proteome Res* 2021; 20: 4801–4814. doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00490.
14. Geyer PE, Holdt LM, Teupser D, Mann M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Molecular Systems Biology* 2017;13:942-956. doi:10.15252/msb.20156297.
15. Adhikari S, Nice EC, Deutsch EW, Lane L, Omenn GS, Pennington SR et al. A high-stringency blueprint of the human proteome. *Nat Commun* 2020;11(1):5310. doi:10.1038/s41467-020-19045-9.
16. Uredba (EU) 2017/746 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 5. aprila 2017 o in vitro diagnostičnih medicinskih pripomočkih ter razveljavitvi Direktive 98/79/ES in Sklepa Komisije 2010/227/EU, ogledano 25. maja 2022 na naslovu <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=CELEX%3A32017R0746>
17. Zander J, Bruegel M, Kleinhempel A, Becker S, Petros S, Kortz L et al. Effect of biobanking conditions on short-term stability of biomarkers in human serum and plasma. *Clin Chem Lab Med* 2014;52: 629-639. doi.org/10.1515/cclm-2013-0705.
18. Keshishian H, Burgess MW, Specht H, Wallace L, Clauser KR, Gillette MA, Carr SA. Quantitative, multiplexed workflow for deep analysis of human blood plasma and biomarker discovery by mass spectrometry. *Nat Protoc* 2017;12(8):1683-1701. doi: 10.1038/nprot.2017.054.
19. Gilquin B, Cubizolles M, Den Dulk R, Revol-Cavalier F, Alessio M, Goujon C-E et al. PepS: An innovative microfluidic device for bedside whole blood processing before plasma proteomics analyses. *Anal Chem* 2021;93(2): 683-690. doi: 10.1021/acs.analchem.0c02270.
20. Božič B, Čučnik S, Kveder T, Rozman B. Affinity and avidity of autoantibodies, In: Shoenfeld Y, Meroni PL, Gershwin ME (Eds). *Autoantibodies*. 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, 2014, doi.org/10.1016/B978-0-444-56378-1.00005-8.
21. Bittremieux W, Tabb DL, Impens F, Staes An, Timmerman E, Martens L, Laukens K. Quality control in mass spectrometry-based proteomics. *Mass Spec Rev* 2018;37: 697-711. doi:10.1002/mas.21544.
22. Uozie AC, Aebersold R. Advancing translational research and precision medicine with targeted proteomics. *Journal of Proteomics* 2018; 189: 1-10. doi: 10.1016/j.jpro.2018.02.021.
23. Bereman MS, Johnson R, Bollinger JG, Boss Y. Implementation of Statistical Process Control for Proteomic Experiments Via LC MS/MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2014; 25(4). doi:10.1007/s13361-013-0824-5.
24. Bell AW, Deutsch EW, CEA, A HUPO test sample study reveals common problems in mass spectrometry-based proteomics. *Nat Methods* 2009; 6:423-430. doi.org/10.1038/nmeth.1333.
25. Richert J. Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. *J Infectiology*. 2019; 2(4): 1-5. doi:10.29245/2689-9981/2019/4.1142.
26. Smith JG, Gerszten RE. Emerging affinity-based proteomic technologies for large scale plasma profiling in cardiovascular disease. *Circulation* 2017;135(17): 1651-1664. doi:10.1161/circulationaha.116.025s446.
27. Gerszten RE, Accurso F, Bernard GR, Caprioli RM, Klee EW, Klee GG et al. Challenges in translating plasma proteomics from bench to bedside: update from NHLBI Clinical proteomics programs. *Am Journal of Physiology* 2008;295:L16-22. doi:10.1152/ajplung.00044.2008.
28. Robbins JM, Peterson B, Schraner D, Tahir UA, Rienmüller T, Deng S et al. Human plasma proteomic profiles indicative of cardiorespiratory fitness. *Nat Metab*. 2021;3(6):786-797. doi: 10.1038/s42255-021-00400-z.
29. Alaaeddine R, fayad M, Nehme E, Bahmad FH, Kobeissy F. The emerging role of proteomics in precision medicine: applications in neurodegenerative diseases and neurotrauma. In: El-Khamisy (ed). *Personalised Medicine, Advances in experimental medicine and biology 1007, ASPS 2017*. doi:10.1007/978-3-3-319-60733-7\_4.
30. Cohn W, Melnik M, Huang C, Teter B, Chandra S, Zhu C et al. Multi-Omics Analysis of Microglial Extracellular Vesicles From Human Alzheimer's Disease Brain Tissue Reveals Disease-Associated Signatures. *Frontiers in Pharmacology* 2021;12: 766082 doi: 10.3389/fphar.2021.766082.
31. Huang Z, Ma L, Huang C, Li Q, Nice EC. Proteomic profiling of human plasma for cancer biomarker discovery. *Proteomics* 2017; 17(6): 1-13. doi 10.1002/pmic.201600240.
32. Nusinow DP, Szpyt J, Ghandi M, Rose CM, E. McDonald R III, Kalocsay M. *Quantitative Proteomics of the Cancer Cell Line Encyclopedia*. *Cell*. 2020; 180(2): 387–402.e16. doi:10.1016/j.cell.2019.12.023.
33. Božič B. Ali smo pripravljeni za vpogled v lastne gene? Moralne in etične dileme. V: Raspor, P (ur.). *[Znanost za mir in razvoj]: Znanje za varovanje zdravja*. Ljubljana: Mednarodni inštitut ECPD za trajnostni razvoj, prostorsko načrtovanje in okoljske študije, 2018. Str. 15-32. ISBN 978-961-288-868-8.
34. Boonen K, Hens K, Menschaert G, baggerman G, Valkenburg D, Ertaylan G. Beyond genes: Re-identifiability of proteomic data and its implication for personalized medicine. *Genes* 2019;10:682. doi:10.3390/genes10090682.
35. Regulation (EU) 2016/679 of the European Parliament and of the Council of 27 April 2016 on the protection of natural persons with regard to the processing of personal data and on the free movement of such data, and repealing Directive 95/46/EC (General Data Protection Regulation) (Text with EEA relevance) Consolidated text. Ogledano 25. maja 2022 na naslovu: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02016R0679-20160504>.
36. Li-Pook-Tham J, Snyder M. iPOP goes the world: integrated personalized omics profiling and the road towards improved health care. *Chem Biol* 2013;20/5: 660-666. doi:10.1016/j.chembiol.2013.05.001.
37. Dugourd A, Kuppe C, Sciacovelli M, Gjerga E, Gabor A, Emdal KB et al. Causal integration of multi-omics data with prior knowledge to generate mechanistic hypotheses. *Molecular systemic biology* 2021;17:e9730. doi 10.15252/msb.20209730.



03

Izvirni strokovni  
in znanstveni  
prispevki

# Ocena merilne negotovosti nekaterih hematoloških parametrov analizatorja Sysmex XN-L 550

## *Estimation of measurement uncertainty of some hematological parameters on Sysmex XN-L 550 analyzer*

**Sebastijan Božič, Milka Ogrin, Polona Likar, Minka Lužovec, Marija Prezelj**  
Zdravstveni dom Vrhnika

Avtor za korespondenco:

**Dr. Marija Prezej, spec. med. biokem.**

Zdravstveni dom Vrhnika, Cesta 6. maja 11, 1360 Vrhnika

e-pošta: [doda.prezelj@gmail.com](mailto:doda.prezelj@gmail.com)

### POVZETEK

Merilna negotovost (angl. *uncertainty of measurement*) je parameter, ki je povezan z rezultatom meritve, in označuje območje raztrosa vrednosti, ki jih je mogoče upravičeno pripisati merjeni veličini. Znotraj tega območja se z določeno stopnjo verjetnosti nahaja prava vrednost rezultata. Namen našega dela je bil, da ocenimo merilno negotovost koncentracije hemoglobina, številčne koncentracije levkocitov, eritrocitov in trombocitov, ki jih določamo s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-L 550. Za ovrednotenje merilne negotovosti smo uporabili šestmesečne podatke o notranji kontroli in zunanji oceni kakovosti ter računalniški program MUkit, katerega osnova je postopek Nordtest. Ovrednotene komponente merilne negotovosti smo primerjali z vrednostmi priporočljive nenatančnosti in odstopanja (angl. *bias*) analiznih rutinskih postopkov v medicinskih laboratorijih, kot jih predlaga RiliBÄK. Primerjali smo jih tudi s specifikacijami kakovosti merilnega postopka, povezanega z biološko variabilnostjo po priporočilih delovne skupine za biološko variabilnost EFLM.

Vrednosti izračunane razširjene merilne negotovosti (U) za hematološke parametre vseh treh koncentracijskih nivojev so bile: za hemoglobin med 2,40 % in 2,79 %, za eritrocite med 2,10 % in 2,43 %, za levkocite med 4,52 % in 5,63 % in za trombocite med 8,93 % in 11,69 %. Vrednosti nenatančnosti in biasa za trombocite so odvisne od koncentracije in se povečujejo, ko se njihova koncentracija zmanjšuje, in s tem se povečuje tudi merilna negotovost.

**Ključne besede:** merilna negotovost, hematološki parametri, specifikacija kakovosti, biološka variabilnost

### ABSTRACT

Measurement uncertainty is a parameter that is related to the measured result and indicates the range of scatter of values that can be justifiably attributed to the measured »

quantity. Within this range, the true value of the result is found with a certain degree of probability.

The purpose of our work was to estimate the measurement uncertainty of hemoglobin concentration, leukocyte, erythrocyte and platelet count determined by the Sysmex XN-L 550 hematology analyzer. The measurement uncertainty was calculated using six months data on internal quality control and external quality assessment and the MUKit program, which is based on the Nordtest method. The evaluated components of measurement uncertainty were compared with the values of recommended imprecision and bias of analytical routine procedures in medical laboratory, as proposed by RiliBÄK. They were also compared with the analytical performance specifications of the measurement

procedure related to biological variability according to the EFLM Working Group on Biological Variability.

The values of the calculated extended measurement uncertainty (U) for the hematological parameters of all three concentration levels were; for hemoglobin between 2.40 % and 2.79 %, for erythrocytes between 2.10 % and 2.43 %, for leukocytes between 4.52 % and 5.63 % and for platelets between 8.93 % and 11.69 %. The imprecision and bias values for platelets are concentration-dependent and increase as their concentration decreases, thus increasing measurement uncertainty.

**Key words:** measurement uncertainty, hematological tests, analytical performance specifications, biological variability

## UVOD

Rezultati merilnih postopkov medicinskega laboratorija so v veliko pomoč pri postavitvi diagnoze ter pri spremljanju bolezni in so koristni za nadaljnje klinične odločitve. Laboratorij mora zagotoviti, da so rezultati merilnih postopkov zanesljivi za klinične namene in tudi primerljivi z vrednostmi rezultatov, dobljenih v različnih obdobjih.

Ustrezna ocena merilne negotovosti v laboratorijski medicini je eden najpomembnejših dejavnikov pri interpretaciji rezultatov (1). Veliko število standardov in smernic kaže na potrebo po uvedbi negotovosti merilnih rezultatov v rutinsko laboratorijsko prakso.

V standardu ISO 15189 je v poglavju "Preiskovalni procesi" navedeno, da mora laboratorij za vsak merilni postopek določiti merilno negotovost (2). Trenutno še ni soglasja glede načina izračuna merilne negotovosti, obstajata pa dva splošna pristopa: izvirni model, imenovan pristop od spodaj navzgor (angl. "bottom-up approach") in model od zgoraj navzdol (angl. "top-down approach"). Ovrednotenje merilne negotovosti od spodaj navzgor zaradi kompleksnosti in zahtevnosti postopka pogosto ni izvedljivo (3, 4). Pristop od zgoraj navzdol je enostavnejši, ker za ovrednotenje merilne negotovosti uporablja podatke o rezultatih kontrolnih vzorcev (notranje in zunanje kontrole), pridobljenih ob vodenju kakovosti dela v laboratoriju. Pristop od zgoraj navzdol je zato bolj primeren in ga je lažje uporabiti predvsem za merilne postopke, ki se izvajajo v vsakodnevni rutini. Vendar tudi pri tem pristopu ni soglasja o postopku izračuna merilne negotovosti. Večina smernic priporoča uporabo naj-

manj šestmesečnih podatkov in ločen izračun merilne negotovosti za različne koncentracijske nivoje (1, 5).

V prispevku smo predstavili izračun merilne negotovosti koncentracije hemoglobina in številčne koncentracije levkocitov, eritrocitov ter trombocitov s pristopom od zgoraj navzdol. Analitično nenatančnost hematoloških parametrov smo ovrednotili s podatki dnevnik kontrolnih vzorcev treh koncentracijskih nivojev. Analitična nenatančnost se razlikuje glede na koncentracijo parametra in ima zato merilna negotovost tudi različne vrednosti. Analitična nenatančnost in s tem tudi merilna negotovost je večja pri koncentracijah spodnje in zgornje meje določanja. Odstopanje (bias) merilnega postopka smo ovrednotili s podatki, dobljenimi pri sodelovanju v medlaboratorijski primerjavi. Merilno negotovost smo izračunali s pomočjo računalniškega programa MUKit (Measurement Uncertainty Kit), katerega osnova je postopek Nordtest, in je bil razvit za okoljske laboratorije v Skandinaviji (6,7). Dobljene ocene merilne negotovosti smo nato primerjali z dovoljenimi vrednostmi, ki jih navaja nemška zdravniška zbornica v smernici za zagotavljanje kakovosti medicinskih laboratorijskih preiskav RiliBÄK, (Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen) (8). Ocenjene vrednosti negotovosti smo primerjali tudi z zelenimi cilji specifikacije kakovosti analiznih postopkov, ki jo je objavila delovna skupina za biološko variabilnost pri Evropskem združenju za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, EFLM) (9).

»



## MATERIALI IN METODE

### Instrument in material

S hematološkim analizatorjem Sysmex XN-L 550 (Sysmex Co., Kobe, Japonska) smo izvedli meritve za določitev številčne koncentracije levkocitov ( $\times 10^9/L$ ), eritrocitov ( $\times 10^{12}/L$ ) in trombocitov ( $\times 10^9/L$ ) ter koncentracijo hemoglobina (g/L). Uporabljeni reagenti in kontrolni vzorci treh nivojev XN-L (Lot 01851 in 02691) so bili pridobljeni od proizvajalca Sysmex. Povezava hematološkega analizatorja v program Sysmex SNCS service IQAS nam omogoča vpogled v mesečno statistično obdelane rezultate kontrolnih vzorcev. Za ovrednotenje prispevka nenatančnosti k merilni negotovosti smo v šestmesečnem obdobju od julija do decembra 2020 uporabili 1440 rezultatov notranje kontrole. Prispevek biasa je bil izračunan na osnovi podatkov, ki so bili pridobljeni pri sodelovanju medlaboratorijske primerjave hematološkega programa RIQAS (RANDOX International Quality Assessment Scheme).

### Ovrednotenje prispevka nenatančnosti oziroma obnovljivost znotraj laboratorija (angl. *within-laboratory reproducibility, R<sub>w</sub>*)

Za oceno nenatančnosti je priporočena uporaba ene same serije kontrolnega vzorca. Ker pa so se serije hematoloških kontrolnih vzorcev menjale vsake tri mesece, smo za dve različni seriji kontrolnih vzorcev za vsak nivo izračunali združeni koeficient variacije (angl. *pooled CV*) po Enačbi 1 (6,10-13). V Enačbi 1 predstavljata  $CV_{L1}$  in  $CV_{L2}$  koeficient variacije za Lot 1 in Lot 2 kontrolnega vzorca za posamezen koncentracijski nivo,  $n_{L1}$  in  $n_{L2}$  pa število kontrolnih vzorcev v Lot1 in Lot2. Dobljeno vrednost združenega CV smo nato pri nadaljnjih izračunih upoštevali kot nenatančnost merilne negotovosti  $u(R_w)$  (Enačba 2).

$$\text{združeni CV} = \sqrt{\frac{CV_{L1}^2 (n_{L1}-1) + CV_{L2}^2 (n_{L2}-1)}{n_{L1} + n_{L2} - 2}} \quad \text{Enačba 1}$$

$$\text{združeni CV} = R_w = u(R_w) \quad \text{Enačba 2}$$

### Ovrednotenje prispevka merilne negotovosti zaradi odstopanja (angl. *bias*)

Metoda Nordtest pri izračunu merilne negotovosti upošteva tudi bias analiznega postopka, ki smo ga ocenili s pomočjo podatkov, pridobljenih v udeležbi medlaboratorijske primerjave. Ovrednoteni sta bili obe komponenti biasa:

- $RMS_{bias}$  (angl. *Root mean square of the bias*) je koren kvadrata povprečne vrednosti posameznih vrednosti odstopanja ( $bias_i$ ) od dodeljene vrednosti. V spodnji enačbi predstavlja  $n_1$  število udeležb laboratorija v zunanji shemi kakovosti ( $n_1=6$ ).

$$RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum(bias_i)^2}{n_1}} \quad \text{Enačba 3}$$

- $u(Cref)$  je povprečna standardna negotovost pripisane ciljne vrednosti. Izračuna se po spodnji enačbi, kjer je  $CV_i$  dobljen iz rezultatov medlaboratorijske primerjave in  $n_i$  število laboratorijev znotraj skupine, ki uporabljajo isto metodo in analizator.

$$u(Cref) = \frac{CV_i}{\sqrt{n_i}} \quad \text{Enačba 4}$$

Bias merilnega postopka se nato izračuna po naslednji formuli:

$$u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(Cref)^2} \quad \text{Enačba 5}$$

### Izračun kombinirane standardne merilne negotovost (angl. *combined standard uncertainty, u<sub>c</sub>*)

Kombinirana standardna negotovost rezultata je kvadratni koren vsote kvadratov posameznih negotovosti; obnovljivosti znotraj laboratorija ( $R_w$ ) in biasa. Izračuna se po Enačbi 6.

$$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} \quad \text{Enačba 6}$$



## Razširjena negotovost (angl. *expanded uncertainty, U*)

Razširjena negotovost je interval, v katerem je rezultat z določeno stopnjo zaupanja in jo dobimo z množenjem kombinirane standardne negotovosti s faktorjem pokritja  $k$  (angl. *coverage faktor, k*) po spodnji enačbi. Faktor pokritja 2 je izbran za 95-odstotni interval zaupanja v primeru normalne porazdelitve.

$$U = k \times u_c \quad \text{Enačba 7}$$

## Ocena merilne negotovosti z zaželenimi cilji kakovosti analiznega postopka

Dobljene rezultate smo primerjali z zaželenimi specifikacijami, povezanimi z biološko variabilnostjo, ki določajo največjo nenatančnost in bias analiznih rutinskih postopkov v medicinskih laboratorijih (15). Zaželeni analitični cilje za nenatančnost, ki temeljijo na intraindividualni biološki variabilnosti smo izračunali z Enačbo 8. Zaželeni analitični cilje za bias, ki temeljijo na intraindividualni in interindividualni biološki variabilnosti, pa smo izračunali z Enačbo 9. Za izračun celokupne analitične napake (angl. *Total Analytical Error, TAE*) smo upoštevali Enačbo 10.

Nenatančnost metode:

$$CV_{\text{imp}} < 0,5 CV_I \quad \text{Enačba 8}$$

Bias metode:

$$CV_{\text{bias}} < 0,25 \times (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2} \quad \text{Enačba 9}$$

Celokupna analitična napaka:

$$TAE = (1,65 \times 0,5 CV_I) + 0,25 \times (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2} \quad \text{Enačba 10}$$

V zgornjih treh enačbah so posamezne oznake za:  $CV_{\text{imp}}$  – koeficient variacije nenatančnosti metode določevanja;  $CV_{\text{bias}}$  – koeficient variacije biasa metode določevanja;  $CV_I$  – koeficient variacije intraindividualne biološke variabilnosti;  $CV_G$  – koeficient variacije interindividualne biološke variabilnosti in TAE – celokupna analitična napaka (Total Analytical Error).

## Statistična analiza

Rezultate merilne negotovosti za navedene hematološke parametre smo izračunali s podatki, dobljenimi iz notranje kontrole in zunanje ocene kakovosti ter programske opreme MUKIT, ki statistično obdela podatke v skladu z vodilom Nordtestom TR537 (13). Programsko opremo so razvili za kemijske laboratorije na finskem inštitutu za okolje SYKE (Suomen ympäristökeskus) in je na spletu dostopna brezplačno (7).

## REZULTATI

### Rezultati komponente nenatančnosti merilne negotovosti

V Tabeli 1 so navedeni rezultati nenatančnosti  $R_w$  notranje kontrole treh koncentracijskih nivojev za hematološke parametre. Iz Tabele 2 je razvidno, da je prispevek nenatančnosti merilne negotovosti  $u(R_w)$  za hemoglobin med 0,50 % in 0,86 %, za eritrocite med 0,60 % in 0,85 %, za levkocite med 1,50 % in 2,25 %, in za trombocite med 1,60 % in 4,40 %.

### Rezultati komponente odstopanja (bias) merilne negotovosti

Izračuni  $RMS_{\text{bias}}$  so bili, kot je razvidno iz Tabele 3, za hemoglobin 1,093 %, za eritrocite 0,857 %, za levkocite 1,675 % in za trombocite 3,838 %. Vrednosti  $u(C_{\text{ref}})$  pa so bile za hemoglobin 0,065 %, za eritrocite 0,071 %, za levkocite 0,197 % in 0,248 % za trombocite. Vrednosti  $u_{\text{(bias)}}$  za hemoglobin so bile 1,095 %, za eritrocite 0,857 %, za levkocite 1,686 % in za trombocite 3,846 %. Kombinirane standardne negotovosti pa so bile za hemoglobin med 1,20 % in 1,39 %, za eritrocite med 1,05 % in 1,21 %, »

za levkocite med 2,26 % in 2,81 % ter za trombocite med 4,17 % in 5,84 %. V Tabeli 4 je naveden povzetek poročila organizatorja zunanje sheme kakovosti za izračun biasa za hemoglobin, eritrocite, levkocite in trombocite. Organizator zunanje sheme kakovosti v svojem poročilu zagotovi podatke o številu sodelujočih laboratorijev ( $n_i$ ), ki so jih upoštevali pri izračunu povprečne vrednosti kontrolnega vzorca in CV.

## Vrednosti razširjene merilne negotovosti

Vrednosti izračunane razširjene merilne negotovosti (U) so bile; za hemoglobin med 2,41 in 2,79 %, za eritrocite med 2,10 in 2,43 %, za levkocite med 4,52 in 5,63 % ter za trombocite med 8,34 in 11,69 % (Tabela 3).

**Tabela 1:** Podatki hematoloških parametrov kontrolnih vzorcev notranje kontrole treh koncentracijskih nivojev za izračun nenatančnosti v pogojih obnovljivosti znotraj laboratorija ( $R_w$ ).

**Table 1:** Internal quality control data of hematological parameters of control samples three concentration levels for calculation within-laboratory reproducibility ( $R_w$ ).

	Kontrolni vzorec nivo 1		Kontrolni vzorec nivo 2		Kontrolni vzorec nivo 3	
	Lot.1851 401	Lot. 2691 401	Lot. 0017 402	Lot. 0101 402	Lot. 0017 403	Lot. 0101 403
Hemoglobin (g/L)	n =58	n =62	n =62	n =59	n =59	n =60
$x_{povp}$	61	60	122	120	164	156
SD	0,6	0,5	0,6	0,6	1,9	0,8
CV (%)	1,0	0,7	0,5	0,5	1,1	0,5
$R_w$ (%)	0,858		0,50		0,852	
Eritrociti ( $10^{12}/L$ )	n=58	n=62	n=62	n=59	n=59	n=60
$x_{povp}$	2,3	2,3	4,2	4,1	5,2	4,9
SD	0,02	0,02	0,03	0,03	0,05	0,03
CV (%)	0,8	0,9	0,6	0,6	0,9	0,6
$R_w$ (%)	0,853		0,60		0,763	
Levkociti ( $10^9/L$ )	n= 62	n=58	n=62	n=59	n=59	n=60
$x_{povp}$	2,47	2,47	6,89	6,86	16,45	16,24
SD	0,06	0,04	0,10	0,10	0,31	0,30
CV (%)	2,6	1,8	1,5	1,5	1,9	1,9
$R_w$ (%)	2,249		1,50		1,625	
Trombociti ( $10^9/L$ )	n=58	n=62	n=62	n=59	n=59	n=60
$x_{povp}$	61	60	234	239	542	524
SD	2,7	2,7	3,9	5,0	8,9	8,4
CV (%)	4,4	4,4	1,7	2,1	1,6	1,6
$R_w$ (%)	4,40		1,905		1,60	

n – število meritev;  $x_{povp}$  – povprečna vrednost meritev; SD – standardni odmik;

CV – koeficient variacije;

$R_w$  – obnovljivosti znotraj laboratorija (*within-laboratory reproducibility*).

**Tabela 2:** Merilna negotovost obnovljivosti znotraj laboratorija ( $u(R_w)$ ) za hemoglobin, eritrocite, levkocite in trombocite v primerjavi z zaželeno specifikacijo analitične učinkovitosti.

**Table 2:** Measurement uncertainty of within-laboratory reproducibility ( $u(R_w)$ ) for hemoglobin, erythrocytes, leukocytes and platelets in comparison to desirable analytical performance specification.

	Konc. nivo	$x_{povp}$	$u(R_w)$ (%)	$CV_{imp}$ zaželene (%)	%U <sub>(max)</sub> RiliBÄK	SZKKLM (%)
Hemoglobin (g/L)	1	60,5	0,86	1,36	4,0	1,0
	2	121	0,50			
	3	160	0,85			
Eritrociti ( $10^{12}/L$ )	1	2,32	0,85	1,40	4,0	1,1
	2	4,16	0,60			
	3	5,07	0,76			
Levkociti ( $10^9/L$ )	1	2,47	2,25	5,05	6,5	6,0
	2	6,88	1,50			2,5
	3	16,35	1,63			1,5
Trombociti ( $10^9/L$ )	1	60,5	4,40	3,55	13,5	4,5
	2	2,37	1,91		8,5	3,0
	3	533	1,60		7,5	5,0

$x_{povp}$  – povprečna vrednost meritev;

$u(R_w)$  – negotovost obnovljivosti znotraj laboratorija (within-laboratory reproducibility);

$CV_{imp}$  – koeficient variacije zaželene natančnosti metode po evropskem združenju za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, EFLM);

%U<sub>(max)</sub> – dovoljeno odstopanje po RiliBÄK (Richtlinie der Bundesaerztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen), SZKKLM – Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino. »

**Tabela 3:** Vrednosti komponent negotovosti, povezani z biasom ( $u_{(\text{bias})}$ ), kombinirane standardne negotovosti  $u_c$ , razširjene negotovosti (U) za hemoglobin, eritrocite, levkocite in trombocite, v primerjavi z želenimi specifikacijami analitične učinkovitosti.

**Table 3:** Uncertainty components associated to the bias ( $u_{(\text{bias})}$ ), combined standard uncertainty ( $u_c$ ) and expanded uncertainty (U) for hemoglobin, erythrocytes, leukocytes and platelets in comparison to the desirable analytical performance specification.

	Nivo	$u(R_w)$	$u(\text{Cref})$	$\text{RMS}_{\text{bias}}$	$u_{(\text{bias})}$	$u_c$	U (%) (k=2)	$\text{CV}_{\text{bias zaželeno}}$	% $U_{(\text{max})}$ RiliBÄK	TAE (%)
Hemoglobin (g/L)	1	0,86	0,065	1,093	1,095	1,39	2,79	1,66	6,0	3,9
	2	0,50				1,20	2,41			
	3	0,85				1,39	2,78			
Eritrociti ( $10^{12}/\text{L}$ )	1	0,85	0,071	0,857	0,857	1,21	2,43	1,72	8,0	4,03
	2	0,60				1,05	2,10			
	3	0,76				1,15	2,31			
Levkociti ( $10^9/\text{L}$ )	1	2,25	0,197	1,675	1,686	2,81	5,63	4,83	18,0	8,96
	2	1,50				2,26	4,52			
	3	1,63				2,34	4,69			
Trombociti ( $10^9/\text{L}$ )	1	4,40	0,248	3,838	3,846	5,84	11,69	4,41	18,0	10,3
	2	1,91				4,29	8,95		15,0	
	3	1,60				4,17	8,34		13,0	

$u(R_w)$  – negotovost obnovljivosti znotraj laboratorija;  $u(\text{Cref})$  in  $\text{RMS}_{\text{bias}}$  sta komponenti  $u_{(\text{bias})}$ ;

$u_{(\text{bias})}$  – negotovost biasa;  $u_c$  – kombinirana standardna negotovost;

U – razširjena negotovost;

$\text{CV}_{\text{bias}}$  – koeficient variacije zaželenega biasa analiznega postopka po evropskem združenju za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, EFLM);

% $U_{(\text{max})}$  – dovoljeno odstopanje po RiliBÄK (Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen);

TAE – celokupna analitična napaka.

»

**Tabela 4:** Rezultati medlaboratorijske primerjave za izračun prispevka biasa merilne negotovosti za hemoglobin, eritrocite, levkocite in trombocite.  
**Table 4:** Results of interlaboratory comparison for assessment of bias component for hemoglobin, erythrocytes, leukocytes, and plateletes.

	Vzorec	Povprečna vrednost	Dobljena vrednost	CV (%)	$n_i$	Bias (%)	$u_{(Cref)}$
Hemoglobin (g/L)	13/7	131,931	132	1,1	308	0,05	0,063
	13/8	62,338	63	1,4	327	1,06	0,077
	13/9	148,900	149	1,0	331	0,07	0,055
	13/10	137,071	138	1,1	317	0,68	0,062
	13/11	152,624	151	1,1	340	-1,06	0,060
	13/12	62,313	61	1,4	344	-2,11	0,075
Eritrociti ( $10^{12}/L$ )	13/7	4,494	4,49	1,1	283	-0,09	0,065
	13/8	2,044	2,04	1,4	310	-0,19	0,080
	13/9	5,050	4,97	1,2	321	-1,58	0,067
	13/10	4,502	4,48	1,2	303	-0,49	0,069
	13/11	5,022	4,99	1,2	308	-0,64	0,068
	13/12	2,002	1,980	1,4	326	-1,10	0,078
Levkociti ( $10^9/L$ )	13/7	9,318	9,37	2,2	129	0,55	0,19
	13/8	2,369	2,40	2,8	146	1,29	0,23
	13/9	15,862	16,34	2,0	148	3,02	0,16
	13/10	8,898	9,11	2,5	157	2,39	0,20
	13/11	21,190	21,20	2,2	151	0,05	0,18
	13/12	2,335	2,34	2,7	161	0,20	0,21
Trombociti ( $10^9/L$ )	13/7	239,347	243,0	3,5	271	1,53	0,21
	13/8	120,591	129,0	4,4	285	6,97	0,26
	13/9	216,227	206,0	4,3	297	-4,73	0,25
	13/10	235,066	238,0	3,8	295	1,25	0,22
	13/11	415,892	414,0	3,5	296	-0,45	0,20
	13/12	115,780	120,0	6,0	310	3,65	0,34

$n_i$  - število sodelujočih laboratorijev upoštevanih pri izračunu;

$u_{(Cref)}$  – povprečna standardna negotovost pripisane ciljne vrednosti;

CV – koeficient variacije obnovljivosti meritve, sporočen v poročilu organizatorja sheme skupaj s povprečno vrednostjo vsakega kontrolnega vzorca. »

## RAZPRAVA

Ocena merilne negotovosti bistveno pripomore pri presoji primernosti metode za klinično uporabo in za primerjavo rezultatov podobnih metod. Obstajajo številne smernice in predpisi, ki pojasnjujejo pomen ocenjevanja merilne negotovosti v kliničnem laboratoriju in predlagajo različne pristope izračuna (1–4). Večina teh dokumentov predlaga pristop “od zgoraj navzdol”.

Temeljita ocena posameznih komponent, ki prispevajo k merilni negotovosti, nam lahko razkrije, kam je treba usmeriti pozornost, da bi izboljšali točnost meritve preiskovalnega postopka.

Za vsak hematološki parameter smo skrbno pregledali povezavo med nenatančnostjo in biasom za vse tri merjene koncentracijske nivoje. Retrospektivne podatke iz mesečnega poročila notranjih kontrolnih vzorcev smo uporabili za izračun prispevka nenatančnosti (within-laboratory reproducibility,  $R_w$ ). Iz Tabele 2 je razvidno, da so rezultati  $u_{R_w}$  za hemoglobin, eritrocite, levkocite in trombocite v mejah zaželenih nenatančnosti ( $CV_{imp}$ ), kot jo navaja delovna skupina za biološko variabilnost pri EFLM, razen za trombocite nizke številčne koncentracije (Nivo 1). Izračunana vrednosti  $u_{R_w}$  trombocitov nivoja 1 je 4,40 % in je večja od predlaganega kriterija zgornje zaželeni meje nenatančnosti 3,55 %. Ob znižanju kriterija nenatančnosti za trombocite pa je dobljena vrednost še v dovoljeni meji minimalnih zahtev vrednosti, ki je 5,33 % (Minimum:  $CV_{imp} \leq 0,75 CV_{intra}$ ). Predlogi delovne skupine za biološko variabilnost pri EFLM so nekoliko strožji, kot je navedeno v bazi podatkov za biološko variabilnost na spletu, ki pa se tudi redno posodablja (15,16).

Medtem ko delovna skupina za biološko variabilnost postavlja enotne kriterije za nenatančnost za vse koncentracijske nivoje tako za hemoglobin, levkocite, eritrocite in trombocite, pa se zahteve RiliBÄK za trombocite razlikujejo glede na njihovo številčno koncentracijo (Tabela 2). In po njihovih kriterijih je nenatančnost rezultatov trombocitov vseh treh koncentracijskih nivojev v sprejemljivih mejah.

V mesečnih kumulativnih poročilih notranje kontrole Monthly Lot Report smo opazili, da je za kontrolne vzorce trombocitov (Nivo 1) znotraj iste skupine, ob velikem številu udeležencev ( $n > 400$ ), koeficient variacije med 6,35 % in 8,65 % in je višji od našega, ki je 4,40 %.

Analitična nenatančnost se razlikuje glede na koncentracijo analita in je večja pri nizkih in visokih vrednostih. Razlika med vrednostmi analitične nenatančnosti posameznih koncentracijskih nivojev hemoglobina, levkocitov in eritrocitov ni bil izrazita, in bi lahko CV vseh treh koncentracijskih nivojev združili in izračunali v samo eno  $u_{R_w}$  po zgoraj omenjeni Formuli 1 (12–14). Pri nizki številčni koncentraciji trombocitov pa je CV izrazilo odstopal, zato je bilo smiselno, da izračunamo prispevek nenatančnosti k merilni negotovosti za vsak nivo posebej.

Dobljena vrednost nenatančnosti  $R_w$  za levkocite nivoja 3 (1,63 %) je višja od kriterija 1,5 %, kot ga navaja Delovna skupina za laboratorijsko hematologijo pri SZKKLM v predlogu Overjanje hematološkega analizatorja ob uvedbi v rutinsko delo (Tabela 2). Nekoliko višja vrednost je verjetno zaradi časovno daljšega izvajanja notranje kontrole (6 mesecev), kot pa traja sam predlagan postopek overjanja (meritev petih vzorcev in pet zaporednih dni) (17).

Bias, ki označuje sistematično napako merilnega postopka, predstavlja odmik rezultata od pričakovane vrednosti. Obe komponenti biasa, tako  $RMS_{bias}$  in  $u(Cref)$  sta bili izračunani s pomočjo podatkov, pridobljenih v medlaboratorijski primerjavi v časovnem obdobju, tako kot navajajo priporočila (6- do 12-mesečno sodelovanje) (6,11–12). Pri medlaboratorijski primerjavi (Tabela 4) so bile vrednosti CV za trombocite med vsemi hematološkimi parametri najvišje in je bil zato tudi prispevek odstopanja  $u_{bias}$  za trombocite velik (3,85 %), medtem ko je bila za hemoglobin 1,095 %, za eritrocite 0,86 % in za levkocite; 1,69 % (Tabela 3). Ti izračuni kažejo, da obe komponenti biasa, tako  $u(Cref)$  in  $RMS_{bias}$  lahko pomembno prispevata k merilni negotovosti. Najmanjši vpliv k celotni merilni negotovosti je predstavljala negotovost pričakovane vrednosti zunanega kontrolnega vzorca. Podobne rezultate so dobili tudi drugi avtorji (18–20).

Da dobimo odgovor, ali je izračunana vrednost razširjene merilne negotovosti ( $U$ ) sprejemljiva, jo je treba primerjati s kriterijem za največjo dovoljeno razširjeno negotovost ( $U_{max}$ ). Vrednost  $U$  je sprejemljiva, če je nižja od predhodno izbranega  $U_{max}$  s strani laboratorija ali enaka. Kako in katere meje izbrati, trenutno še ni določeno, na splošno pa veljajo in se tudi najširše uporabljajo meje, izpeljane iz biološke variabilnosti (21–23). Izbira sprejemljive vrednosti je tako lahko odvisna od samega kliničnega laboratorija,



razen če meje temeljijo na zakonskih meroslovnih zahtevah, kot jih navaja npr. nemški RiliBÄK. Po njihovih zahtevah so vse naše dobljene vrednosti razširjenih negotovosti v dovoljenih mejah (Tabela 3).

Izračun za celokupno analitično napako (TAE), ki upošteva intraindividualne in interindividualne biološke variabilnosti, pa ponovno pokaže previsoko odstopanje za nizko številčno koncentracijo trombocitov. Formula za izračun celokupne analitične napake je enostavna za uporabo, vendar je treba koncept TAE uporabljati previdno (24–29).

Podatek o nenatančnosti številčne koncentracije trombo-

citov kontrolnega vzorca z nizkim številom trombocitov je zanimiv ne samo za laboratorij, da bomo v bodoče pozorno spremljali tako nenatančnost kot tudi bias za trombocite za vsak koncentracijski nivo posebej, ampak tudi za proizvajalce *in vitro* diagnostike (IVD), da raziščejo in odpravijo ugotovljeno težavo ter si prizadevajo za izboljšanje kakovosti delovanja analiznega testa (14, 19, 23).

Kadar bodo vrednosti nenatančnosti posameznih koncentracijskih nivojev analita podobne, bomo izračunavali združeno nenatančnost in bo s tem še poenostavljeno ovrednotenje merilne negotovosti.

## ZAKLJUČEK

Za celovito zanesljivost merilnih postopkov je pomembno, da poleg rednega spremljanja vrednosti kontrol kakovosti, v najmanj šestmesečnem intervalu ovrednotimo tudi merilno negotovost, ki nam omogoča, da lahko postavimo cilje za izboljšavo analiznih postopkov v medicinskem laboratoriju.

V prispevku smo predstavili praktični primer, kako lahko z razpoložljivimi podatki v medicinskem laboratoriju na razmeroma enostaven način ovrednotimo merilno negotovost rutinskih hematoloških parametrov s pomoč-

jo računalniškega programa MUKit, katerega osnova je postopek Nordtest 537, ki je namenjen za izračun merilne negotovosti okoljskih laboratorijev. S tem zagotovimo zahtevam standardov, da mora laboratorij pri interpretaciji izmerjenih vrednosti analiznih postopkov upoštevati merilno negotovost, in da mora na zahtevo uporabnikov laboratorijskih storitev nuditi svoje ocene merilne negotovosti. Upamo, da bo ta prispevek spodbuda laboratorijem, da ovrednotijo merilno negotovost rutinskim laboratorijskim analitom.



## LITERATURA

1. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Expression of measurement uncertainty in laboratory medicine; approved guideline. CLSI EP29-A. Wayne, PA: CLSI, 2012.
2. Slovenski Inštitut za standardizacijo (SIST). International Organization for Standardization (ISO). Medicinski laboratoriji - Zahteve za kakovost in kompetentnost. SIST EN ISO 15189. Slovenija, SIST, marec 2013.
3. Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM). Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement. 3rd edition. JCGM 100. [Internet]. Sèvres, France: JCGM; 2008. [Dostop 22. maj 2020]. Dostopno na: <https://www.bipm.org/en/committees/jc/jcgm/publications>
4. EURACHEM/CITAC, Guide CG4: Quantifying uncertainty in analytical measurement [Internet]. 3er ed. Eurachem, 2012; [Dostop 20. maj 2019]. Dostopno na: <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/quam>
5. Singapore Accreditation Council (SAC). Technical Guide 4. A Guide on Measurement Uncertainty in Medical Testing [Internet]. Singapore 2019; [Dostop 3. julij 2020] Dostopno na: <https://www.sac-accreditation.gov.sg/files/documents/laboratory-accreditation/medical-testing-and-medical-imaging-documents/medical-testing-field/Technical-Guide-4-29-Mar-19.pdf>
6. Magnusson B, Naykki T, Hovind H, Krysell M, Sahlin E. Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, Nordtest Report 537. [Internet] Nordic Innovation Center, 2017 Ed 4.1. [Dostop 23. marec 2019]. Dostopno na: <http://www.nordtest.info/wp/2017/11/29/handbook-for-calculation-of-measurement-uncertainty-in-environmental-laboratories-nt-tr-537-edition-4/>
7. Virtanen A, Naykki T, Varkony E. Mukit – Measurement uncertainty kit [Internet]. SYKE, Nordic Innovation Center, Helsinki 2019. [Dostop 13. april 2020] Dostopno na: [https://www.syke.fi/en-US/Services/Quality\\_and\\_laboratory\\_services/Calibration\\_services\\_and\\_contract\\_laboratory/MUKit\\_\\_Measurement\\_Uncertainty\\_Kit](https://www.syke.fi/en-US/Services/Quality_and_laboratory_services/Calibration_services_and_contract_laboratory/MUKit__Measurement_Uncertainty_Kit)

8. Bundesärztekammer. Neufassung der „Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen – RiliBÄK“. Deutsches Ärzteblatt [Internet]. Berlin, dec 2019. [Dostop 14. januar 2020]. Dostopno na: [https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user\\_upload/downloads/pdf-Ordner/QS/Rili\\_BAEK\\_Qualitaetssicherg\\_laboratoriumsmedUntersuchungen\\_2019.pdf](https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/QS/Rili_BAEK_Qualitaetssicherg_laboratoriumsmedUntersuchungen_2019.pdf)
9. Coskun A, Braga F, Carobene A, Ganduxe XT, Aarsand AK, Fernandez-Callea P, et al. Systematic review and meta-analysis of within-subject and between-subject biological variation estimates of 20 haematological parameters. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2019 Sept 19 [Dostop 2. marec 2021];58(1):25-32. Dostopno na: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2019-0658/html>
10. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2019-0658/html>
11. Slovenska akreditacija. Smernice ILAC-G17:01/2021 za merilno negotovosti pri kvantitativnem preskušanju. Dokument OA10, 2021.
12. Slovenska akreditacija. Merilna negotovost pri vzorčenju in kemijskem preskušanju [Internet]. 2019, Izdaja 4, Dokument AO3 [Dostop 3. marec 2021]. Dostopno na: <https://www.slo-akreditacija.si/wp-content/uploads/2016/06/OA03-izdaja5-slo.pdf>
13. Magnusson B, Hovind H, Krysell M, Lund U, Makinen. Handbook for Chemical laboratories. Internal quality control. Nordtest Report 569. [Internet] Nordic Innovation Center, 2018. [Dostop 22. marec 2019]. Dostopno na: [http://www.nordtest.info/wp/wp-content/uploads/2018/04/NT\\_TR\\_569\\_cd5\\_1\\_Internal\\_Quality\\_Control\\_English.pdf](http://www.nordtest.info/wp/wp-content/uploads/2018/04/NT_TR_569_cd5_1_Internal_Quality_Control_English.pdf)
14. Ceriotti F. Deriving proper measurement uncertainty from Internal Quality Control data: An impossible mission? *Clin Biochem*. 2018 Mar 30;57:37-40.
15. Rigo-Bonnin R, Diaz-Troyano N, Garcia-Tejada L, Galindo-Marce A, Asensio-Valbuena M, Canalias F. Estimation of measurement uncertainty and practical suggestion for the description of the metrological traceability in clinical laboratories. *Biochem Med* [Internet]. 2021 feb 15 [Dostop 20. marec 2021];31:1. Dostopno na: <https://doi.org/10.11613/BM.2021.010501>
16. Aarsand AK, Fernandez-Callea P, Webster C, Coskun A, Gonzales-Lao E, Diaz-Garzon J, et al. The EFLM Biological Variation Database. European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine [Internet]. [Dostop 20. marec 2020]; Dostopno na: <https://biologicalvariation.eu/>
17. Badrick T. Biological variation: Understanding why it is important? *Pract Lab Med* [Internet]. 2021 Jan 4 [Dostop 20. marec 2020];23:e00199. Dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352551720301621>
18. Podgornik H, Trampuš-Bakija A, Uljarević P, Berce K, Božnar-Alič E. Predlog poenotenja navodil za overjanje hematološkega analizatorja ob uvedbi v rutinsko delo. [Internet]. Slovenija, Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino; 2018 [Dostop 4. maj 2019]. Dostopno na: [https://www.szkkml.si/assets/images/upload/Predlog\\_overjanja\\_hematoloskega\\_analizatorja.pdf](https://www.szkkml.si/assets/images/upload/Predlog_overjanja_hematoloskega_analizatorja.pdf)
19. Padoan A, Antonelli G, Aita A, Sciacovelli L, Plebani M. An approach for estimating measurement uncertainty in medical laboratories using data from long-term quality control and external quality assessment schemes. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2017 Feb 28 [Dostop 21. marec 2020];55(11). Dostopno na: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2016-0896/html>
20. Braga F, Panteghini M. The utility of measurement uncertainty in medical laboratories. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2020 Mar 3 [Dostop 21. dec 2020];58:1407-13. Dostopno na: <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-1336>
21. Cui M, Xu L, Wang H, Ju S, Xu S, Jing R. Combining Nordtest method and bootstrap resampling for measurement uncertainty estimation of hematology analytes in a medical laboratory. *Clin Biochem* [Internet]. 2017 dec [Dostop 2. dec 2019]; 18. Dostopno na: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/tjb-2020-0357/html>
22. Yavuz HB
23. Karahan SC, Yaman H, Orem A, Aliyazicioglu. Two approaches for uncertainty estimation: which role for bias? Complete blood count experience. *Turk J Biochem* [Internet]. 2021 maj. [Dostop 2. dec 2019]; Dostopno na: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/tjb-2020-0357/html>
24. Braga F, Panteghini M. Performance specifications for measurement uncertainty of common biochemical measurands according to Milan models. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2021 Mar 17. [Dostop 3. dec 2021]; Dostopno na: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2021-0170/html>
25. Braga F, Pasqualetti, Panteghini M. The role of external quality assessment in the verification of in vitro medical diagnostics in the traceability era. *Clin Biochem* [Internet]. 2018 julij [Dostop 2. dec 2019];57:23-28. Dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009912018300031?via%3Dihub>
26. Johnson P, Shahram S, Astle R. Managing biological variation data: modern approaches for study design and clinical application. *Crit Rev in Clin Lab Sci* [Internet]. 2021 15. jun [Dostop 2. feb 2021];58(7) 493-512. Dostopno na: <https://doi.org/10.1080/10408363.2021.1932718>
27. Farrance I, Badrick T, Frenkel R. Uncertainty in measurement and total error: different roads to the same quality destination? *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2018 Jun 27 [Dostop 3. nov 2019];56(12). Dostopno na: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2018-0421/html>
28. Oosterhuis WP, Teodorsson E. Total error vs. measurement uncertainty: revolution or evolution? *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2015 Nov 5 [Dostop 3. nov 2019];54(2):235-9. Dostopno na: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2015-0997/html>
29. Oosterhuis WP, Bayat H, Armbruster D, Coskun A, Freeman KP, Kallner A, Koch D, et al. The use of error and uncertainty methods in the medical laboratory. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2018 [Dostop 2. dec 2019]; 56(2):209–19. Dostopno na: <https://doi.org/10.1515/cclm-2017-0341>
30. Westgard JO. Error Methods Are More Practical, But Uncertainty Methods May Still Be Preferred. *Clin Chem* [Internet]. 1. april 2018 [Dostop 3 nov 2019];64(4):636-638. Dostopno na: [Dostop 3. dec 2020] <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.284406>
31. Miller WG, Schimmel H, Rej R, Greener N, Ceriotti F, Burns C, et al. IFCC Working Group Recommendations for Assessing Commutability Part 1: General experimental design. *Clin Chem* [Internet]. 2018 marec 1 [Dostop 3. nov 2019];64(3):47-54. Dostopno na: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.277525>

# Določanje koncentracije popkovničnega bilirubina za napoved razvoja patološke zlatenice pri novorojenčkih

## *Measurement of cord blood bilirubin for prediction of pathological jaundice*

**Petra Malavašič<sup>1</sup>, Samo Penič<sup>2</sup>, Danijela Furlan<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Splošna bolnišnica Novo mesto, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko

Avtor za korespondenco:

**Petra Malavašič**

Splošna bolnišnica Novo mesto, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Šmihelska cesta 1, 8000 Novo mesto  
e-pošta: petra.malavasic@sb-nm.si

### POVZETEK

Patološka hiperbilirubinemija se pojavi pri okoli 10 % novorojenčkov, in če ostane nezdravljena, lahko vodi v resne okvare osrednjega živčevja. Smiselno je iskanje zgodnjega (napovednega) biooznačevalca, ki bi lahko pravočasno odkril tiste novorojenčke, ki so nagnjeni k razvoju patološke zlatenice. Z raziskavo smo želeli ugotoviti, ali je koncentracija bilirubina v popkovnični krvi zanesljiv biooznačevalec za napoved pojava patološke hiperbilirubinemije. Pokazali smo, da lahko z 90-odstotno specifičnostjo in 92-odstotno občutljivostjo napovemo, da novorojenčki z nizkimi koncentracijami popkovničnega bilirubina ( $\leq 25 \mu\text{mol/L}$ ) ne bodo razvili patološke zlatenice, da pa jo bodo novorojenčki z visokimi koncentracijami bilirubina ( $\geq 45 \mu\text{mol/L}$ ). V naši raziskavi je takšne vrednosti popkovničnega bilirubina imelo 24 % novorojenčkov. Pri preostalih (76 %) novorojenčkih se je določanje koncentracije bilirubina v popkovnični krvi izkazalo kot nezanesljiv biooznačevalec za napoved razvoja patološke zlatenice.

**Ključne besede:** popkovnični bilirubin, zlatenica, hiperbilirubinemija, novorojenček

### ABSTRACT

Pathological hyperbilirubinemia occurs in about 10 % of newborns and, if left untreated, can lead to serious central nervous system damage. It is therefore reasonable to seek an early (predictive) biomarker that could identify in a timely manner those newborns who are prone to developing pathological jaundice. The aim of the study was to determine whether the concentration of bilirubin in umbilical cord blood is a reliable biomarker for predicting the occurrence of pathological hyperbilirubinemia. We showed that with 90 % specificity and 92 % sensitivity, we can predict that newborns with low concentrations of umbilical cord blood bilirubin ( $\leq 25 \mu\text{mol/L}$ ) will not develop pathological jaundice, and that newborns with high concentrations of bilirubin ( $\geq 45 \mu\text{mol/L}$ ) will. In our study, 24 % of newborns had such umbilical cord blood bilirubin levels. In the remaining (76 %) newborns, however, determination of umbilical cord blood bilirubin levels proved to be an unreliable biomarker for predicting the development of pathological jaundice.

**Key words:** umbilical cord blood bilirubin, jaundice, hyperbilirubinemia, newborn

»

## UVOD

Visoka koncentracija bilirubina je nevarna zaradi povečanja prostega bilirubina, ki deluje nevrotoksično. Približno 10 % novorojenčkov razvije patološko obliko zlatenice in zato potrebuje ustrezno zdravljenje (1, 2).

Zlatenica je rumeno obarvanje kože ter beločnic in pri večini (60–80 %) novorojenčkov je fiziološka. Razvije se v nekaj dneh po rojstvu, ker zaradi (1) učinka pospešene propadanja rdečih krvničk, ko novorojenček preide na atmosferski kisik, (2) nezrelih jetrnih encimov in zato počasnejše presnove bilirubina, (3) premajhne količine albumina za vezavo vsega prostega bilirubina in (4) zaradi počasnejše prebave pri novorojenčku prihaja do absorpcije barvila iz črevesja v krvni obrok (1, 2, 3).

Zgornja meja za fiziološko zlatenico je odvisna od starosti in teže novorojenčka in je še nižja, če ima novorojenček dodatne zdravstvene zaplete (2). Za fiziološko hiperbilirubinemijo je značilno, da se zlatenica pojavi tretji ali četrty dan po rojstvu in koncentracije celokupnega bilirubina po navadi ne presežejo 250  $\mu\text{mol/L}$ . Ko se novorojenčkovi mehanizmi prilagodijo na zunanje okolje, se tudi serumske koncentracije bilirubina v 10–14 dneh po rojstvu znižajo (2, 4).

Patološko zlatenico lahko laboratorijsko določimo, če (1) vrednosti celokupnega bilirubina v krvi novorojenčka presežejo 86  $\mu\text{mol/L}$  že v prvih 24 urah, (2) koncentracija celokupnega bilirubina kadarkoli naraste za več kot 86  $\mu\text{mol/L}$  v obdobju 24 ur ali (3) koncentracija celokupnega bilirubina kadarkoli preseže 290  $\mu\text{mol/L}$  (2, 4). Patološka zlatenica nastane zaradi imunsko posredovane hemolitične bolezni

## MATERIALI IN METODE

V raziskavo smo vključili 2149 novorojenčkov, rojenih v porodnem oddelku Splošne bolnišnice Novo mesto, z gestacijsko starostjo nad 37 tednov in težo nad 2400 g. Raziskava je potekala retrospektivno z odobritvijo Komisije za medicinsko etiko Republike Slovenije (številka dopisa 33/05/04). Vzorec popkovnične krvi smo pridobili ob rojstvu otroka. Po prerezu popkovnice smo v porodni sobi v epruveto s K2EDTA antikoagulantom odvzeli priporo-

(najpogostejša oblika je neskladje v AB0 krvnoskupinskem sistemu) in neimunsko posredovane hemolize (najpogostejše zaradi dednih bolezni eritrocitov) ter nekaterih drugih stanj (sepsa novorojenčka). Dejavniki tveganja za nevrotoksično delovanje bilirubina so tudi polimorfizmi v genu za konjugacijo bilirubina, nizka gestacijska starost, nizka telesna teža in hipoksija. Hiperbilirubinemijo zdravijo z obsevanjem novorojenčka z modro lučjo, v redkih primerih je potrebno zdravljenje z izmenjalno transfuzijo (5, 6).

Zaradi potencialne nevrotoksičnosti bilirubina je smiselno iskanje bioznačevalca, s katerim bi pravočasno odkrili tiste novorojenčke, ki so bolj nagnjeni k razvoju patološke zlatenice in tako zmanjšali možnost razvoja nevroloških poškodb. Odvzem bilirubina iz popkovnične krvi je neinvaziven postopek in z rezultati določitve njegove koncentracije bi tako ocenili tveganje za razvoj patološke zlatenice.

Opravljenih je bilo več študij o določanju koncentracije popkovničnega bilirubina kot napovedniku razvoja patološke zlatenice (7–22). Zaradi neskladnosti rezultatov današnje klinične smernice še ne vključujejo določanja popkovničnega bilirubina v rutinski praksi (8).

Cilj raziskave je bil ugotoviti, ali določanje koncentracije bilirubina v popkovnični krvi takoj po rojstvu napove, ali bo novorojenček razvil patološko hiperbilirubinemijo. Zanimalo nas je, do katere vrednosti popkovničnega bilirubina novorojenčki ne bodo razvili patološke hiperbilirubinemije in tako ne bodo potrebovali zdravljenja s fototerapijo, in nad katero vrednostjo jo bodo razvili.

čeno količino venske popkovnične krvi. Vzorec smo zaščitili pred svetlobo in ga transportirali do Oddelka za laboratorijsko diagnostiko, kjer smo ga centrifugirali 15 minut na 3500 g. Vzorec plazme smo analizirali s kolorimetrično metodo na analizatorju Ektachem Vitros 350 (Kodak, ZDA) po principu suhe kemije. Določili smo celokupni bilirubin, ki je seštevek nekonjugiranega in konjugiranega bilirubina, in je značilen za novorojenčke do starosti 14 dni. »

Novorojenčkom smo potem po ustaljeni klinični praksi odvzeli še vzorce krvi za serumsko analizo celokupnega bilirubina. Koncentracijo celokupnega bilirubina smo določili z isto metodo kot v popkovnični krvi. Ovrednotili smo povezavo med bilirubinom, izmerjenim v popkovnični krvi ob rojstvu, in njegovo koncentracijo v serumu v prvih dnevih življenja.

Rezultate smo ovrednotili z odprtokodnim programskim jezikom Python ter knjižnico za obdelavo podatkov Pan-

das. Podatki v rezultatih predstavljajo povprečno vrednost  $\pm$  SD. Podatke smo statistično ovrednotili z ROC krivuljo, ki smo jo izrisali v programskem paketu R in tako določili mejno vrednost, pod katero novorojenčki ne razvijejo patološke zlatenice in nad katero jo. Določili smo tudi koeficient kapa, ki omogoča dihotomno vrednotenje popkovničnega bilirubina kot označevalca razvoja patološke zlatenice. Koeficient kapa  $< 0,2$  pomeni slabo, med  $0,21$  in  $0,40$  zadovoljivo, med  $0,41$  in  $0,60$  zmerno, med  $0,61$  in  $0,80$  dobro ter med  $0,81$  in  $1,00$  zelo dobro ujemanje.

## REZULTATI

Od 2149 novorojenčkov jih je 75,8 % oz. 1629 razvilo fiziološko zlatenico in povprečna vrednost popkovničnega bilirubina je v tej skupini znašala  $30,3 \pm 7,5$   $\mu\text{mol/L}$  (povprečje  $\pm$  SD). Najnižja izmerjena vrednost je v tej skupini novorojenčkov znašala 7  $\mu\text{mol/L}$ , najvišja pa 52  $\mu\text{mol/L}$ . V času hospitalizacije je patološko zlatenico razvilo 24,2 % oz. 520 novorojenčkov. Povprečna koncentracija popkovničnega bilirubina je v tej skupini znašala  $38,1 \pm 9,1$   $\mu\text{mol/L}$  (slika 1). Najvišja izmerjena vrednost je v skupini novorojenčkov s patološko zlatenico dosegla 93  $\mu\text{mol/L}$ , najnižja pa 20  $\mu\text{mol/L}$ .

Koncentracijo popkovničnega bilirubina do 20  $\mu\text{mol/L}$  je imelo 124 novorojenčkov (5,8 %), od teh 73 dečkov in 51 deklic. Pri vrednosti popkovničnega bilirubina med 20 in 30  $\mu\text{mol/L}$  je 621 novorojenčkov (28,9 %) razvilo fiziološko zlatenico (325 dečkov in 296 deklic). Patološko zlatenico je v tej skupini razvilo 72 novorojenčkov (49 dečkov in 23 deklic). Če so bile koncentracije popkovničnega bilirubina med 30 in 40  $\mu\text{mol/L}$ , so 703 (32,7 %) novorojenčki razvili fiziološko (340 dečkov in 363 deklic), 264 (12,3 %) pa patološko zlatenico (155 dečkov in 109 deklic). Če so bile koncentracije popkovničnega bilirubina med 40 in 50  $\mu\text{mol/L}$  je fiziološko zlatenico razvilo 172 (8,0 %) novorojenčkov (82 dečkov in 90 deklic), patološko zlatenico pa 128 (6,0 %) (73 dečkov in 55 deklic). Pri še višjih koncentracijah popkovničnega bilirubina, nad 50  $\mu\text{mol/L}$ , jih je fiziološko zlatenico razvilo 9 (0,4 %; 4 dečki in 5 deklic), patološko pa 101 (4,7 %) novorojenček (27 dečkov in 29 deklic) (slika 1).

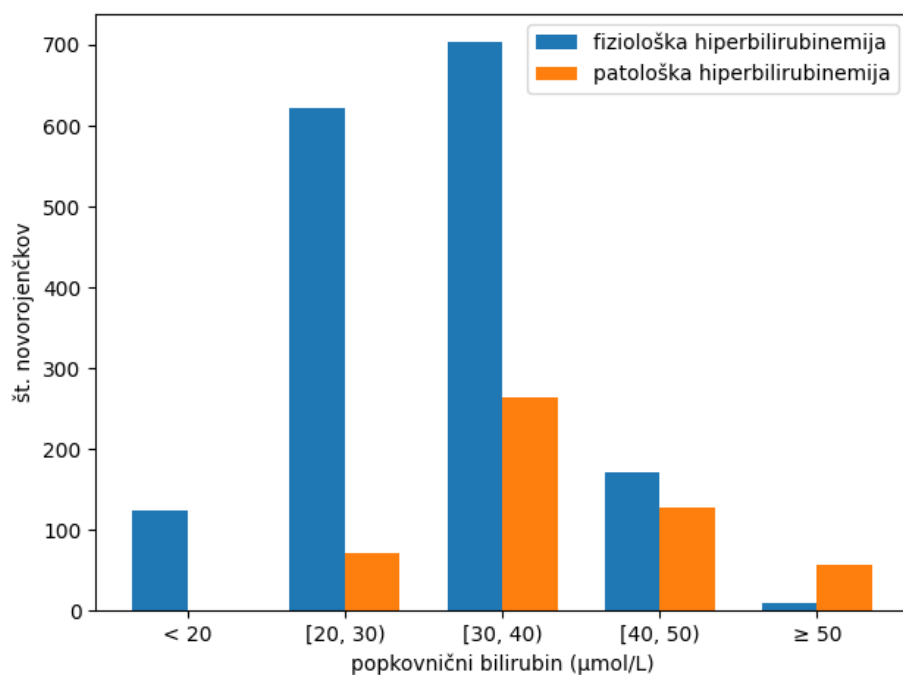
Z naraščanjem koncentracije popkovničnega bilirubina narašča delež novorojenčkov, ki je razvil patološko zlatenico (slika 2). Pri koncentraciji popkovničnega bilirubi-

na do 20  $\mu\text{mol/L}$  nobeden ni razvil patološke zlatenice. V skupini novorojenčkov s koncentracijo popkovničnega bilirubina med 20 in 30  $\mu\text{mol/L}$  jih je 10,4 % razvilo patološko zlatenico; če so imeli koncentracijo popkovničnega bilirubina med 20 in 40  $\mu\text{mol/L}$ , je patološko zlatenico razvilo 27,3 %, v skupini s koncentracijo popkovničnega bilirubina med 40 in 50  $\mu\text{mol/L}$  pa je 42,7 % novorojenčkov razvilo patološko zlatenico. Če so imeli koncentracijo popkovničnega bilirubina nad 50  $\mu\text{mol/L}$ , pa jih je kar 86,2 % razvilo patološko obliko zlatenice.

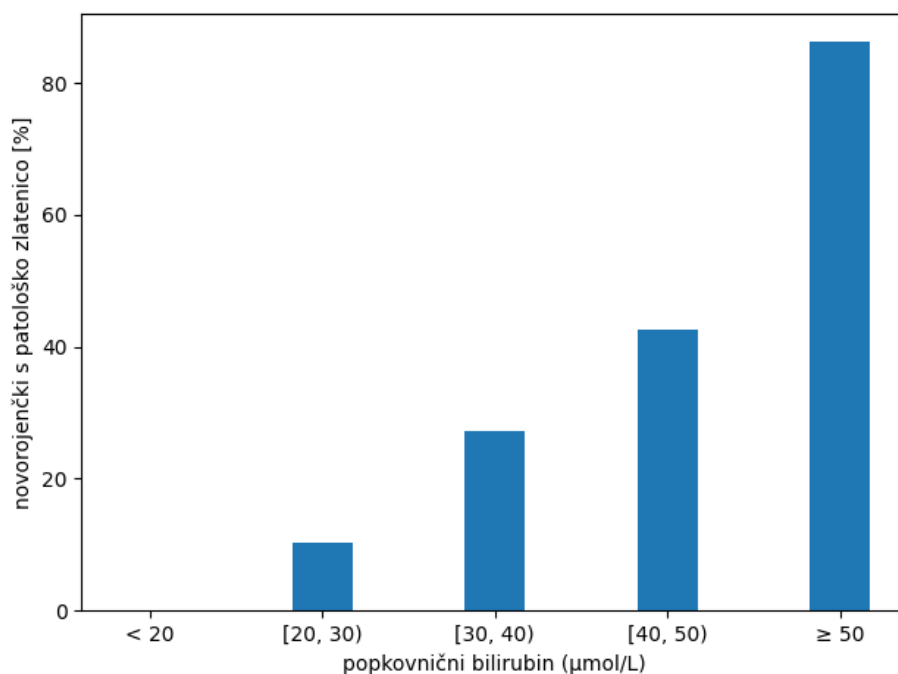
S pomočjo ROC krivulje smo statistično določili mejno vrednost, ki loči med tistimi novorojenčki, ki ne razvijejo patološke hiperbilirubinemije, in tistimi, ki jo. Ta znaša 31  $\mu\text{mol/L}$  v popkovnični krvi (83-odstotna občutljivost in 52-odstotna specifičnost). Površina pod krivuljo znaša 0,745 pri 95-odstotnem intervalu zaupanja. Koeficient kapa pri tej mejni vrednosti znaša 0,24.

Da bi izboljšali občutljivost in specifičnost metode, smo določili dve mejni vrednosti, ki bolje ločita med tistimi novorojenčki, ki razvijejo patološko hiperbilirubinemijo, in tistimi, ki je ne. Pri mejni vrednosti  $\leq 25$   $\mu\text{mol/L}$  (novorojenček ne bo razvil patološke hiperbilirubinemije) in  $\geq 45$   $\mu\text{mol/L}$  (novorojenček bo razvil patološko hiperbilirubinemijo) je občutljivost 92-odstotna in specifičnost 90-odstotna (slika 4). Površina pod krivuljo znaša 0,929. Koeficient kapa pri mejnih vrednostih  $\leq 25$   $\mu\text{mol/L}$  in  $\geq 45$   $\mu\text{mol/L}$  znaša 0,68.

»

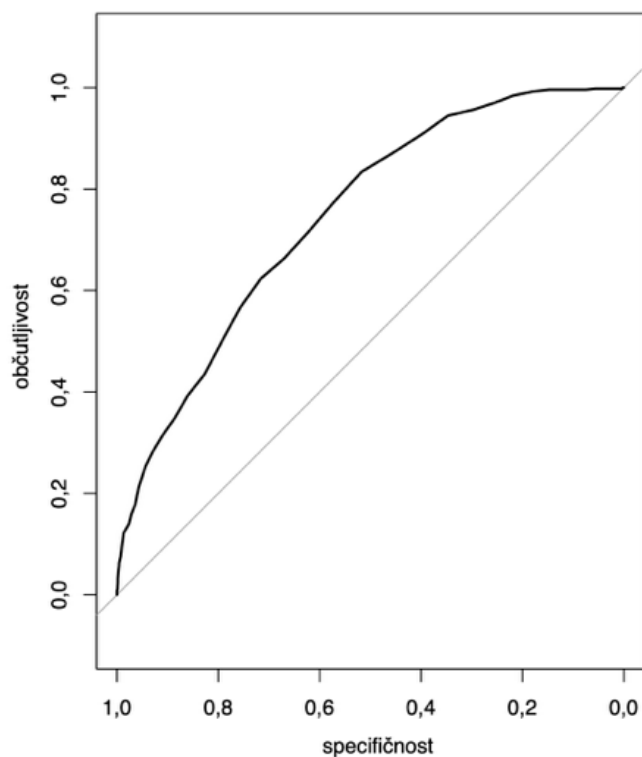


Slika 1: Število novorojenčkov s fiziološko in patološko zlatenico v odvisnosti od koncentracije popkovničnega bilirubina.  
Figure 1: Number of neonates with physiological and pathological jaundice as a function of umbilical bilirubin concentration.



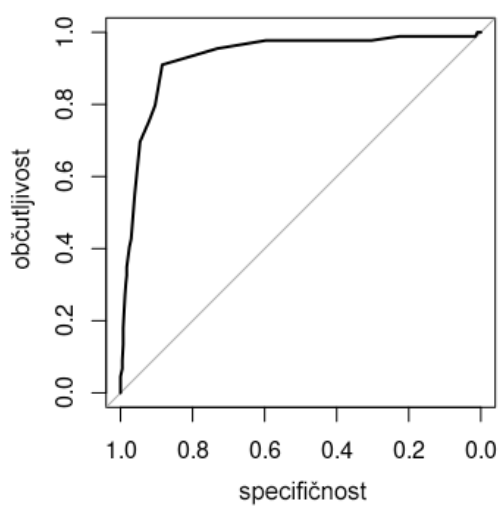
Slika 2: Pri višjih izmerjenih koncentracijah popkovničnega bilirubina več novorojenčkov razvije patološko obliko zlatenice.  
Figure 2: At higher measured concentrations of umbilical bilirubin, more neonates developed pathological hyperbilirubinemia. >>





Slika 3: ROC krivulja z mejno vrednostjo 31  $\mu\text{mol/L}$  za napoved razvoja patološke hiperbilirubinemije.

Figure 3: ROC curve with a cut-off value of 31  $\mu\text{mol/L}$  to predict the development of pathological hyperbilirubinemia.



Slika 4: ROC krivulja z mejnima vrednostma  $\leq 25 \mu\text{mol/L}$  in  $\geq 45 \mu\text{mol/L}$  za napoved razvoja patološke hiperbilirubinemije.

Figure 4: ROC curve with cut-off values  $\leq 25 \mu\text{mol/L}$  and  $\geq 45 \mu\text{mol/L}$  to predict the development of pathological hyperbilirubinemia >>



## RAZPRAVA

V raziskavi smo pokazali, da lahko z 90-odstotno specifičnostjo in 92-odstotno občutljivostjo preko določitve celokupnega bilirubina iz popkovnične krvi napovemo, da novorojenčki z nizkimi koncentracijami popkovničnega bilirubina ( $\leq 25 \mu\text{mol/L}$ ) ne bodo razvili patološke zlatenice, tisti z visokimi koncentracijami bilirubina ( $\geq 45 \mu\text{mol/L}$ ) pa jo bodo.

Od 60 do 80 % zdravih novorojenčkov po rojstvu normalno razvije fiziološko obliko neonatalne hiperbilirubinemije. V naši skupini je 76 % novorojenčkov razvilo fiziološko hiperbilirubinemijo. Razlog je predvsem v še nerazvitem jetrnem sistemu encimske konjugacije z glukuronsko kislino, kar vodi v kopičenje nekonjugiranega bilirubina v krvi, zmanjšanjem jetrnem prevzemu bilirubina, zmanjšani sintezi albumina in povečani enterohepatični cirkulaciji. V maternici je plod v razmeroma hipoksičnih razmerah ( $p\text{O}_2$  popkovnične krvi je 28 mmHg), kar vodi v večje izločanje eritropoetina, zato imajo novorojenčki povečano količino eritrocitov. Ko novorojenček prvič pride v stik z atmosferskim kisikom, pride do povečane hemolize zaradi oksidativnih poškodb eritrocitov in sproščanja hemoglobina. Novorojenčkovi eritrociti imajo krajšo življenjsko dobo (80 dni). Vsi ti dejavniki prispevajo k nastanku fiziološke zlatenice. Vrednosti bilirubina se pri fiziološki hiperbilirubinemiji brez zdravljenja v 10–14 dneh po rojstvu spontano zmanjšajo (5, 6).

Patološka oblika hiperbilirubinemije se pojavi pri okoli 10 % novorojenčkov (2, 4), v naši skupini se je pojavila pri 24 %. To je stanje, ko koncentracija serumskega bilirubina (1) v prvih 24 urah preseže 86  $\mu\text{mol/L}$ , (2) narašča za več kot 86  $\mu\text{mol/L}$  dan oz. (3) kadarkoli preseže vrednost 290  $\mu\text{mol/L}$ . V naši raziskavi pri koncentraciji popkovničnega bilirubina do 20  $\mu\text{mol/L}$  nobeden od novorojenčkov ni razvil patološke zlatenice.

Patološko hiperbilirubinemijo je razvilo 24 % novorojenčkov (koliko izmed teh novorojenčkov je potrebovalo zdravljenje s fototerapijo, nismo preverjali) s povprečno koncentracijo popkovničnega bilirubina  $38,1 \pm 9,1 \mu\text{mol/L}$ . Mejna vrednost koncentracije popkovničnega bilirubina, pod katero novorojenček ne bo razvil patološke zlatenice, je določena z ROC krivuljo in znaša 31  $\mu\text{mol/L}$  (83-odstotna občutljivost, 52-odstotna specifičnost). Furlan in sodelavci so v študiji na slovenskih novorojenčkih postavili mejo, po kateri novorojenček ne bo razvil patološke zlatenice, pri koncentracijah popkovničnega bilirubina 28  $\mu\text{mol/L}$  (85-odstotna občutljivost in 60-odstotna specifičnost) (10, 11). Rafi in sodelavci so 2019 v študiji pokazali, da je mejna vrednost za razvoj patološke zlatenice koncentracija popkovničnega bilirubina 34,2  $\mu\text{mol/L}$  (90-

odstotna občutljivost, 84-odstotna specifičnost). Predlagajo, da bi vse novorojenčke z izmerjenimi vrednostmi popkovničnega bilirubina nad 34,2  $\mu\text{mol/L}$  daljši čas zadržali na opazovanju v porodnišnici (18). Castillo in sodelavci pa so določili mejno vrednost popkovničnega bilirubina na 31,6  $\mu\text{mol/L}$  (92-odstotna občutljivost, 70-odstotna specifičnost) in praviijo, da določanje popkovničnega bilirubina zmanjša potrebo po invazivnem določanju serumskega bilirubina (9). Vsi avtorji zaključujejo, da so njihove postavljene mejne vrednosti uporabne pri napovedi razvoja patološke zlatenice. Naši rezultati pa kažejo, da postavljena mejna vrednost 31  $\mu\text{mol/L}$  (83-odstotna občutljivost in 52-odstotna specifičnost ter 0,59 točnost) ni ustrezna za napoved razvoja patološke zlatenice. Če bi ne glede na popkovnični bilirubin vsakega novorojenčka označili, da ne bo razvil patološke zlatenice, bi bili v 76 % primerih točni, ker je v naši skupini 76 % takih novorojenčkov, ki niso razvili patološke zlatenice. Pri določeni mejni vrednosti 31  $\mu\text{mol/L}$  pa znaša točnost 59 %, kar pomeni, da metoda določanja popkovničnega bilirubina za napoved razvoja patološke zlatenice ni primerna. Metodo smo izboljšali tako, da smo postavili dve mejni vrednosti: mejna vrednost  $\leq 25 \mu\text{mol/L}$  in  $\geq 45 \mu\text{mol/L}$ , pri katerih z 92-odstotno občutljivostjo in 90-odstotno specifičnostjo pravilno napovemo, ali bo novorojenček razvil patološko zlatenico. Izmed 2149 novorojenčkov pa je samo 23 % takih, pri katerih bi pri vrednostih popkovničnega bilirubina  $\leq 25 \mu\text{mol/L}$  oz.  $\geq 45 \mu\text{mol/L}$  pravilno napovedali, ali bodo razvili patološko zlatenico ali ne. Pri preostalih novorojenčkih (74 %) določanje popkovničnega bilirubina nima napovedne vrednosti za patološko zlatenico.

Koncentracijo popkovničnega bilirubina pri določeni mejni vrednosti lahko vrednotimo dihotomno (negativno, pozitivno), zato smo izračunali še koeficient kapa. Ta je pri mejni vrednosti 31  $\mu\text{mol/L}$  0,23, kar pomeni, da je določanje koncentracije popkovničnega bilirubina za napoved patološke zlatenice neprimerno. Pri postavitvi dveh mejnih vrednosti ( $\leq 25 \mu\text{mol/L}$  in  $\geq 45 \mu\text{mol/L}$ ) pa koeficient kapa znaša 0,62, kar pomeni, da je takšna klasifikacija novorojenčkov za napoved razvoja patološke zlatenice dobra. »

Da bi dodatno izboljšali statistiko za napoved razvoja patološke zlatenice novorojenčkov, bi bilo smiselno vpeljati kombinacijo parametrov oz. analitov, ki bi tako bolje ločila tiste novorojenčke, ki bodo razvili patološko zlatenico, od tistih, ki je ne bodo. Nekaj novejših študij poleg popkovničnega bilirubina kot bioznačevalca za napoved razvoja patološke zlatenice vključuje še popkovnični albumin (22, 23, 24).

## ZAKLJUČEK

Naši rezultati kažejo, da novorojenčki z vrednostmi popkovničnega bilirubina, nižjimi od 24  $\mu\text{mol/L}$ , niso v nevarnosti, da bi razvili patološko zlatenico in so lahko ob ostalih normalnih izvidih prej odpuščeni v domačo oskrbo. Pri

koncentraciji popkovničnega bilirubina nad 45  $\mu\text{mol/L}$  pa bodo novorojenčki z veliko verjetnostjo razvili patološko zlatenico.

## LITERATURA

- Hansen, T. W., Wong, R. J., & Stevenson, D. K. (2020). Molecular physiology and pathophysiology of bilirubin handling by the blood, liver, intestine, and brain in the newborn. *Physiological reviews*, 100(3), 1291-1346.
- Porter ML, Dennis BL. Hyperbilirubinemia in the term newborn. *Am Fam Physician*. 2002 Feb 15;65(4):599-606. PMID: 11871676.
- Mitra, S., & Rennie, J. (2017). Neonatal jaundice: aetiology, diagnosis and treatment. *British Journal of Hospital Medicine*, 78(12), 699-704.
- American Academy of Pediatrics Subcommittee on Hyperbilirubinemia. (2004). Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics*, 114(1), 297-316.
- Ullah, S., Rahman, K., & Hedayati, M. (2016). Hyperbilirubinemia in neonates: types, causes, clinical examinations, preventive measures and treatments: a narrative review article. *Iranian journal of public health*, 45(5), 558.
- Lauer, B. J., & Spector, N. D. (2011). Hyperbilirubinemia in the newborn. *Pediatrics in Review-Elk Grove*, 32(8), 341.
- Guan, H., Li, H., Luo, J., Lin, L., Wang, Y., Xiao, Y., & Xu, H. (2017). Early predictive value of cord blood bilirubin and dynamic monitoring of transcutaneous bilirubin for hyperbilirubinemia of newborns. *Saudi journal of biological sciences*, 24(8), 1879-1883.
- Jones, K. D., Grossman, S. E., Kumaranayakam, D., Rao, A., Fegan, G., & Aladangady, N. (2017). Umbilical cord bilirubin as a predictor of neonatal jaundice: a retrospective cohort study. *BMC pediatrics*, 17(1), 186.
- Castillo, A., Grogan, T. R., Wegrzyn, G. H., Ly, K. V., Walker, V. P., & Calkins, K. L. (2018). Umbilical cord blood bilirubins, gestational age, and maternal race predict neonatal hyperbilirubinemia. *PloS one*, 13(6).
- Furlan, D., Ilijaš-Trofenik, A., Weber, V., Felc, Z., Bratanič, B., & Lukač-Bajalo, J. (2010). Bilirubin v popkovnični krvi kot napovednik neonatalne hiperbilirubinemije. *Zdravniški vestnik*, 79, 482-7.
- Furlan, D., Žalec, L., Pavlin, T., Gradecki, M., Mevželj, D. O., & Bratanič, B. (2013). Prediction of hyperbilirubinemia by noninvasive methods in full-term newborns. *Slovenian Medical Journal*, 82(3).
- Meshram, R. M., Merchant, S., Bhongade, S. W., Pathan, S. N. (2019). Utility of cord blood bilirubin as a predictors of significant neonatal Hyperbilirubinemia in healthy term neonate. *International journal of contemporary pediatrics*, 6(5).
- Ahire, N., Sonawane, R., Gaikwad, R., Patil, S., & Sonawane, T. (2016). Study of correlation of cord blood bilirubin with neonatal hyperbilirubinemia. *MVP Journal of Medical Science*, 3(1), 60-66.
- Bhat, J. A., Sheikh, S. A., & Ara, R. (2019). Correlation of cord blood bilirubin values with neonatal jaundice in healthy newborns: A prospective observational study. *Archives of Medicine and Health Sciences*, 7(1), 48.
- Pahuja, M., Dhawan, S., & Chaudhary, S. R. (2016). Correlation of cord blood bilirubin and neonatal hyperbilirubinemia in healthy newborns. *Int J Contemp Pediatr*, 3(926), e30.
- Aktas, S., Dogan, C., Okmen, Z. H., & Gulec, S. G. (2019). Is Cord Blood Bilirubin Level a Reliable Predictor for Developing Significant Hyperbilirubinemia?. *American journal of perinatology*, 36(03), 317-321.
- Risemberg, H. M., Mazzi, E., MacDonald, M. G., Peralta, M., & Heldrich, F. R. E. D. E. R. I. C. K. (1977). Correlation of cord bilirubin levels with hyperbilirubinaemia in ABO incompatibility. *Archives of disease in childhood*, 52(3), 219-222.
- Rafi, S., Gandikota, V., Belavadi, G. (2019). Prediction of neonatal hyperbilirubinemia by cord blood analysis to diagnose subsequent hyperbilirubinemia. *International Journal of Contemporary Pediatrics*. 6. 1658. 10.18203/2349-3291.ijcp20192772.
- Khairy, M. A., Abuelhamd, W. A., Elhawary, I. M., & Nabayel, A. S. M. (2019). Early predictors of neonatal hyperbilirubinemia in full term newborn. *Pediatrics & Neonatology*, 60(3), 285-290.
- Zhurova, M., Akabutu, J., & Acker, J. (2012). Quality of red blood cells isolated from umbilical cord blood stored at room temperature. *Journal of blood transfusion*, 2012.
- Grohmann, K., Roser, M., Rolinski, B., Kadow, I., Müller, C., Goerlach-Graw, A., ... & Küster, H. (2006). Bilirubin measurement for neonates: comparison of 9 frequently used methods. *Pediatrics*, 117(4), 1174-1183.
- Bhat, J. A., Sheikh, S. A., & Ara, R. (2019). Cord blood bilirubin, albumin, and bilirubin/albumin ratio for predicting subsequent neonatal hyperbilirubinemia. *Paediatrica Indonesiana*, 59(5), 244-51.
- Sharma, I., Kumar, D., Singh, A., & Mahmood, T. (2020). Ratio of cord blood bilirubin and albumin as predictors of neonatal hyperbilirubinemia. *Clinical and Experimental Hepatology*, 6(4), 384-388.
- El Mashad, G. M., El Sayed, H. M., & El Shafie, W. A. (2019). Cord blood albumin-bilirubin as a predictor for neonatal hyperbilirubinemia. *Menoufia Medical Journal*, 32(3), 1071.





04

Povzetki  
predavanj  
na strokovnih  
srečanjih  
SZKKLM

# Mali gosti LDL kot proaterogeni označevalec

## *Small dense LDL – proatherogenic biomarker*

**Nina Cugmas**

Splošna bolnišnica Celje, Oddelek za laboratorijsko medicino

### UVOD

Lipoproteini nizke gostote (LDL) so s holesterolom bogati lipoproteini, ki prenašajo okoli 70 % plazemskega holesterola (1). Zvišana vrednost LDL-holesterola (LDL-hol) je eden glavnih dejavnikov tveganja za razvoj srčno-žilnih bolezni (SŽB). Nekatere študije so pokazale, da so lastnosti LDL delcev bolj pomembne, kot pa sama vrednost

LDL-hol. Poleg razlik v velikosti in gostoti se LDL delci razlikujejo tudi v kemijski sestavi zaradi številnih modifikacij, ki so jim podvrženi v krvi (2, 3, 4, 5). Identifikacija posameznikov z večjim tveganjem za SŽB bi morala temeljiti na določitvi koncentracije LDL-hol in lastnosti LDL delcev (6).

### PODRAZREDI LDL IN METODE DOLOČANJA

Lipoproteini se razlikujejo po velikosti, gostoti in sestavi lipidov ter apolipoproteinov. Na osnovi fizikalnih in kemijskih lastnosti jih razdelimo v več razredov. LDL delci so opredeljeni kot frakcija lipoproteinov z gostoto 1,019–1,063 g/mL. Z različnimi laboratorijskimi metodami ločimo delce LDL v posamezne podrazrede.

Ultracentrifugiranje je bilo prva metoda, s katero so ločili različne frakcije LDL. Na osnovi gostote LDL delcev so opredeljeni trije podrazredi LDL:

- LDL I: 1,025–1,034 g/mL,
- LDL II: 1,034–1,044 g/mL,
- LDL III: 1,044–1,060 g/mL (2).

V nekaterih študijah so ločili tudi zelo male delce LDL (LDL IV). Podrazreda LDL III in IV predstavljata mali gosti LDL (sdLDL) (2).

Druga, pogosto uporabljena metoda za določitev podrazredov LDL, je gradientna gelska elektroforeza (GGE) brez denaturacije. S to metodo delce LDL ločijo na osnovi njihove elektroforetske mobilnosti, ki je odvisna od velikosti in oblike lipoproteina. Glede na premer LDL delcev so opredeljeni štirje podrazredi:

- LDL I: 26,0–28,5 nm,
- LDL II: 25,5–26,4 nm,
- LDL III A in B: 24,2–25,5 nm,
- LDL IV A in B: 22,0–24,1 nm (2).

Ostale metode za določitev posameznih frakcij LDL so: nuklearna magnetna resonanca (NMR), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), dinamično sipanje laserske svetlobe, analiza gibanja ionov in avtomatizirane homogene metode določanja. Slednje so še posebej primerne za uporabo v vsakdanji klinični praksi (2).

»

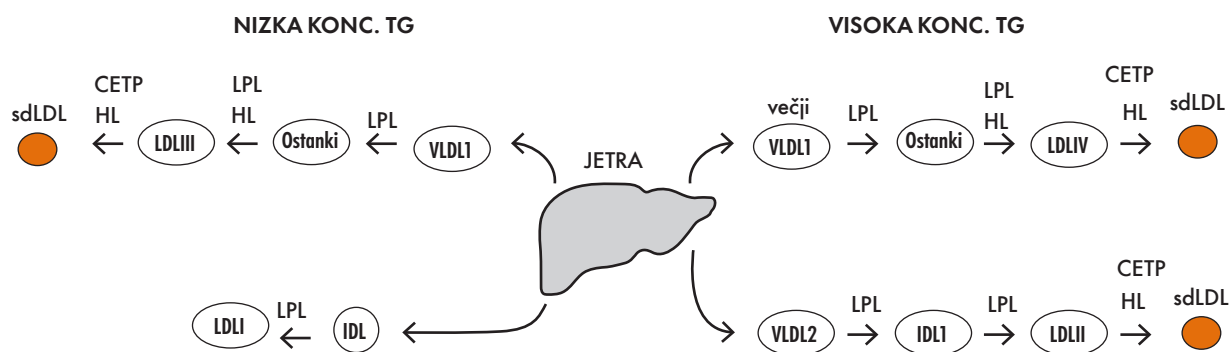
Na podlagi vrste prisotnih podrazredov LDL ločimo fenotip A in B. Za fenotip A je značilno večje število lbLDL delcev (large buoyant, gostota < 1,044 g/mL, velikost > 25,5 nm), za fenotip B pa večje število sdLDL delcev (gostota > 1,044 g/mL, velikost < 25,5 nm). Ugotovili so, da se fenotip B pogosteje pojavlja v določenih bolezenskih stanjih,

kot so presnovne bolezni, debelost, sladkorna bolezen tipa 2 (SB2), koronarna srčna bolezen in možganska kap. Fenotip B je povezan tudi z zvišanimi vrednostmi trigliceridov (TG), znižanim holesterolom v lipoproteinih velike gostote (HDL-hol) in z večjo aktivnostjo jetrne lipaze (2).

## NASTANEK sdLDL

Študije kažejo, da delci sdLDL nastanejo po dveh poteh, ki sta odvisni od koncentracije TG. V primeru nizkih koncentracij TG se iz jeter izločijo lipoproteini zelo majhne gostote (VLDL1) in lipoproteini srednje gostote (IDL), če pa so vrednosti TG visoke, se iz jeter izločijo VLDL1 in VLDL2. IDL in VLDL2 delci vsebujejo manj TG in po delovanju encima lipoproteinske lipaze (LPL) nastanejo iz njih LDL delci podrazredov I in II. Iz VLDL1 delcev, bo-

gatih s TG, nastanejo po delovanju encimov LPL in jetrne lipaze LDL delci podrazredov III in IV. Na nastanek sdLDL delcev vpliva poleg jetrne lipaze tudi aktivnost prenašalnega proteina za holesterolne estre (CETP). Slednji iz LDL delcev podrazredov II, III in IV odstranjuje holesterolne estre v zameno za TG, ki jih razgradi jetrna lipaza. Vsi ti procesi vodijo do nastanka delcev sdLDL (2, 7).



**Slika 1:** Hipotetična shema nastanka podrazredov LDL. sdLDL – mali gosti LDL; CETP – transportni protein za holesterolne estre; HL – jetrna lipaza; LPL – lipoproteinska lipaza; TG – trigliceridi; IDL – lipoprotein srednje gostote; LDLI-IV – lipoprotein nizke gostote podrazred I, II, III, IV; VLDL – lipoprotein zelo nizke gostote. Prirejeno po (2).

**Figure 1:** Hypothetical scheme of metabolic origins of LDL subclasses. sdLDL – small dense LDL; CETP – cholesterol ester transfer protein; HL – hepatic lipase; LPL – lipoprotein lipase; TG – triglycerides; IDL – intermediate density lipoprotein; LDL I-IV – low density lipoprotein subclasses I, II, III, IV; VLDL – very low density lipoprotein. Adapted from (2). »

## ATEROGENE OBLIKE sdLDL IN TVEGANJE ZA RAZVOJ SRČNO-ŽILNE BOLEZNI

Študije na celičnih kulturah so pokazale, da nativni delci LDL ne povzročajo nalaganja lipidov, medtem ko so spremenjeni delci LDL (oksidirani, desializirani, glikirani, elektronegativni) močno aterogeni. Spremenjeni delci LDL imajo tudi provnetne lastnosti in so nagnjeni k agregaciji ter nastanku kompleksov, ki njihovo aterogenost še povečajo (2).

Dokazali so, da je sdLDL bolj dovzeten za aterogene spremembe kot pa ostali podrazredi LDL. Razlogi so naslednji:

- sdLDL je manjši od ostalih podrazredov LDL, zato lažje prehaja skozi endotelij in povzroča aterosklerotične spremembe.
- sdLDL ima manjšo afiniteto do receptorjev LDL kot ostali podtipi LDL, zato je njegov prevzem zmanjšan. Zaradi tega se sdLDL dalj časa zadržuje v krvnem obtoku, kar pomeni večjo možnost za aterogene spremembe.
- sdLDL ima večjo afiniteto do proteoglikanov v arterijski steni, kar prav tako podaljša čas zadrževanja v subendotelijskem prostoru in pomeni več možnosti za aterogene spremembe (2, 7).

Zadnji dve značilnosti sta posledici strukturnih sprememb v apolipoproteinskem B (Apo B) delu sdLDL (7).

Prva aterogena sprememba LDL, ki so jo odkrili raziskovalci, je bila oksidacija LDL, vendar se le-ta zgodi v kasnejši stopnji po seriji predhodnih modifikacij. Znano je, da so predhodno spremenjeni delci LDL bolj dovzetni za oksidacijo (8). Delci sdLDL so bolj dovzetni za oksidacijo predvsem zaradi svoje lipidne sestave in manjše vsebnosti antioksidativnih vitaminov (2). Receptorji na makrofagu imajo desetkrat večjo afiniteto za oksidirani LDL (oLDL) kot pa za nativni LDL. Število receptorjev na membrani celic se po vstopu oLDL v celico ne zmanjša, zato se

oLDL kopičijo v makrofagu, kar pospeši njihovo pretvorbo v penasto celico (9).

Čeprav je oksidacija najbolj znana aterogena sprememba LDL, pa so kasnejše študije pokazale, da je najpomembnejša desializacija, ki je verjetno celo prva aterogena sprememba delcev LDL v seriji vseh aterogenih modifikacij. Študije na celičnih kulturah, pridobljenih iz aterosklerotičnih lezij, so pokazale, da v primerjavi z nativnimi delci LDL desializirani LDL delci lažje prehajajo v celice, vendar pa je njihova znotrajcelična razgradnja zmanjšana in desializirani LDL se kopiči v celicah. Desializirani LDL je v primerjavi z nativnim LDL manjši, ima večjo gostoto, je bolj elektronegativen in bolj dovzeten za oksidacijo. Pri posameznikih s fenotipom B ima sdLDL nižjo vsebnost sialične kisline v primerjavi z lbLDL. Desializirani delec sdLDL ima tudi večjo afiniteto do proteoglikanov v arterijski steni (2, 8, 10).

Glikirani LDL nastane pri neencimski reakciji glukoze in njenih presnovkov s prosto amino skupino lizina na apoB-100. Pri pacientih s presnovnim sindromom in SB2 so ugotovili, da je sdLDL bolj dovzeten za glikacijo (8).

Specifično vlogo delcev sdLDL v patogenezi ateroskleroze so raziskovali v številnih študijah. Dokazali so, da sta zvečano število delcev sdLDL (fenotip B) in zvišana vrednost sdLDL-hol povezana z večjim tveganjem za razvoj SŽB. Nekatere študije so pokazale, da je koncentracija sdLDL-hol boljši označevalec ocene tveganja za koronarne srčne bolezni kot pa celokupni LDL-hol. Delci sdLDL so manjši in vsebujejo manj holesterola, vendar zvečano število sdLDL delcev pomeni povečano število aterogenih delcev, kar pa ni nujno, da se odraža tudi v vrednosti LDL-hol (2, 11, 12).

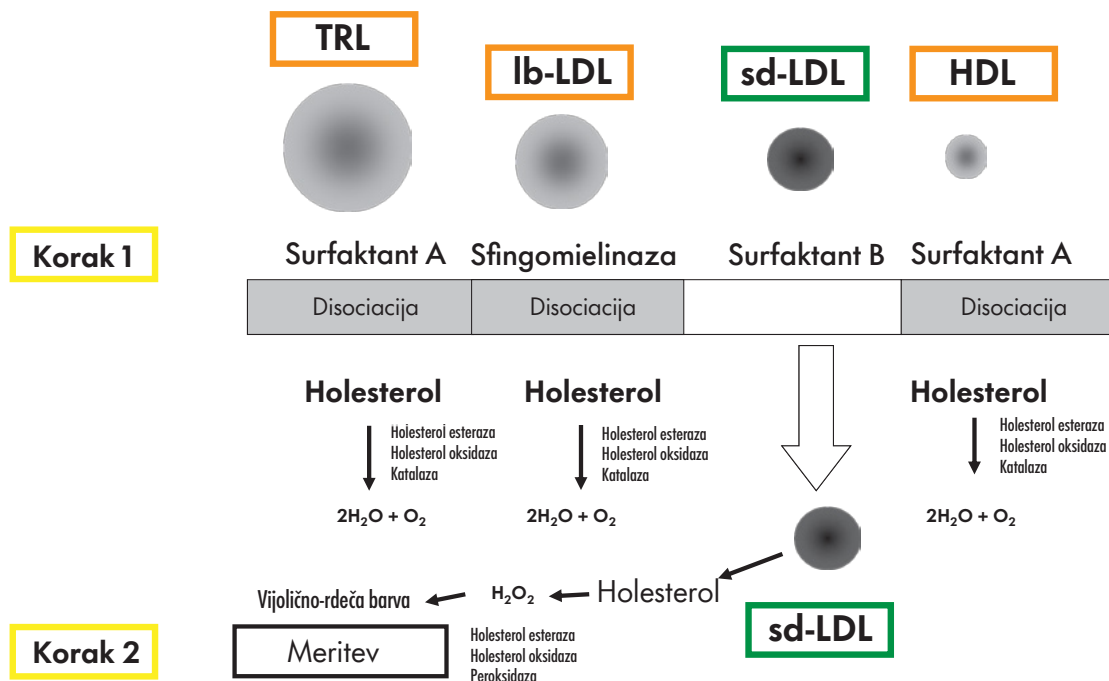




## HOMOGENA AVTOMATIZIRANA METODA ZA DOLOČITEV sdLDL-HOL

Metode, kot so ultracentrifugiranje, GGE, NMR in HPLC, niso primerne za rutinsko analizo sdLDL (draga oprema, zapletena tehnika, dolg čas analize). Pomemben korak je bil narejen z razvojem homogene metode, ki so jo prvi opisali Hirano et al. Sledile so modifikacije, s katerimi so poenostavili analizni postopek. Preiskovali so vpliv dveh surfaktantov: enega, ki bo razgradil NE-LDL lipoproteine, in drugega, ki bo zaščitil sdLDL delce pred učinkom sfingomielinaze in holesterol oksidaze ter holesterol esteraze. Uporaba sfingomielinaze in kombinacija dveh surfaktantov sta omogočili razvoj avtomatiziranega homogenega testa za določitev sdLDL-hol (2, 13).

lbLDL delci vsebujejo več sfingomielina kot sdLDL, zato encim sfingomielinaza prednostno razgradi lbLDL. V prvi stopnji reakcije surfaktant A in sfingomielinaza razgradita HDL, lb-LDL in TG, medtem ko surfaktant B zaščiti sdLDL pred delovanjem sfingomielinaze, holesterol oksidaze in holesterol esteraze. Iz HDL, lb-LDL in TG se sprosti holesterol, ki ga holesterol oksidaza in holesterol esteraza razgradita. V naslednji stopnji reakcije pride do sprostitve holesterola iz sdLDL, ki ga določimo s klasično encimsko kolorimetrično reakcijo za določanje holesterola (13).



**Slika 2:** Postopek homogene metode za določitev sdLDL holesterola. TG – trigliceridi; lb-LDL – large buoyant LDL; sd-LDL – mali gosti LDL. Prirejeno po (7).

**Figure 2:** The principle of homogeneous assay for sdLDL-cholesterol. TG – triglycerides; lb-LDL – large buoyant LDL; sd-LDL – small dense LDL. Adapted from (7).

## ZAKLJUČEK

S študijami so dokazali, da so različni podrazredi LDL različno aterogeni in da je sdLDL-hol pomemben dejavnik tveganja za razvoj SŽB. Z uporabo različnih metod, s katerimi določamo podrazrede LDL, prihaja do razlik med rezultati, zato je preučevanje vloge sdLDL pri razvoju ateroskleroze in SŽB oteženo. Velik napredek so doseg-

li z razvojem homogene avtomatizirane metode, ki je primerna tudi za rutinsko uporabo. Trenutno je sdLDL-hol omenjen kot dodaten dejavnik tveganja za razvoj aterosklotične bolezni srca in ožilja v smernicah AACE (American Association of Clinical Endocrinologist) in NCEPIII (National Cholesterol Education Program III).

## LITERATURA

1. Košnik M, Štajer D. *Interna medicina*. 5. izd. Ljubljana. Medicinska fakulteta; Slovensko zdravniško društvo; Knjigotrštvo Buča; 2018. str. 928.
2. Ivanova E, Myasoedova V, Melnichenko A, Grechko A, Orekhov A. Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Disease: review article. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017 May;2017:1-10.
3. St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Bernard PM, Despres JP, et al. Comparison of Various Electrophoretic Characteristics of LDL Particles and Their Relationship to the Risk of Ischemic Heart Disease. *Circulation* 2001; 104:2295-2299.
4. Packard CJ. Small dense low-density lipoprotein and its role as an independent predictor of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2006; 17(4):412-417.
5. Rizzo M., Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *QJ Med*. 2006;99:1-14.
6. Vekic J, Zeljkovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N, Memon L, et al. Small, dense LDL cholesterol and apolipoprotein B: Relationship with serum lipids and LDL size. *Atherosclerosis*. 2009;207:496-501.
7. Basabdatta S. Small Dense Low-Density Lipoprotein: Biomarker or Potential Drug Target: review article. *Ann Natl Acad Med Sci (India)*. 2019;55:92-97.
8. Summerhill V, Grechko A, Yet S, Sobenin I, Orekhov A. The Atherogenic Role of Circulating Modified Lipids in Atherosclerosis: review. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul;20(14): 3561.
9. Ribarič S. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9. izd. Ljubljana. Univerza v Ljubljani; Medicinska fakulteta Inštitut za patološko fiziologijo; 2005. str. 241.
10. Orekhov AN, Ivanova EA, Melnichenko AA, Sobenin IA. Circulating desialylated low density lipoprotein. *Cor et Vasa*. 2017;59:149-156.
11. Ai M, Otokozawa S, Asztalos BF, Ito Y, Nakajima K, White CC, et al. Small Dense low density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease: results from the Framingham offspring study. *Clin Chem*. 2010;56(6):967-976.
12. Arai H, Kokubo Y, Watanabe M, Sawamura T, Ito Y, Minagawa A, et al. Small dense low-density lipoproteins cholesterol can predict incident cardiovascular disease in an urban japanese cohort. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*
13. Ito Y, Fujimura M, Ohta M, Hirano T. Development of a Homogeneous Assay for Measurement of Small Dense LDL Cholesterol. *Clin Chem*. 2011 Jan;57(1):57-65.

# Krvna slika: stare težave, nove rešitve

**Tadej Furlan**

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za hematologijo

Pri izdajanju rezultatov krvne slike moramo biti zaposleni v laboratorijih zelo pozorni, saj se v sami analizi skriva veliko prikritih nevšečnosti, ki jih je treba odkriti in rešiti, preden izdamo končni izvid.

V hematologiji že veliko časa uporabljamo parametre, pri katerih se trenutno izvajajo številne študije glede novih načinov klinične uporabe. Eden izmed takih je koeficient variacije volumna eritrocitov (angl. *red cell distribution width; RDW*). RDW je del eritrocitnih indeksov. Z njim pridobimo kvantitativno informacijo o razporeditvi eritrocitov v krvi glede na njihovo velikost (volumen). Določamo ga s pomočjo hematološkega analizatorja in je del rezultatov krvne slike. Ta parameter je, poleg hemoglobina in povprečnega volumna eritrocitov (MCV), zelo pomemben pri razvrščanju anemij.

Zadnja leta pa ugotavljajo, da je RDW zelo pomemben tudi kot prognostični označevalec pri kroničnem srčnem popuščanju in pri bolnikih z okužbo s SARS-CoV-2. Program CHARM (okr. Candesartan in Heart Failure: Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity) je v študiji določil 36 laboratorijskih parametrov, ki jih že veliko let določajo v laboratorijih, in bi lahko imeli prognostični pomen pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem. Ugotovili so, da je izmed vseh 36 parametrov, ki so jih izbrali za analizo, zvišan RDW najmočnejši označevalec za neugoden izid in je močno povezan s smrtnostjo pri bolnikih s srčnim popuščanjem (1).

Pri hospitaliziranih bolnikih z okužbo s SARS-CoV-2 pa so ugotovili povezavo med zvišanim RDW ob sprejemu v bolnišnico in zvišanim RDW med hospitalizacijo ter povečano verjetnostjo za neugoden izid bolezni (2).

Poleg novih načinov uporabe že ustaljenih parametrov so v sodobni hematologiji pomembni tudi novi načini same analize le-teh. Starejši hematološki analizatorji so določali eritrocite in trombocite s pomočjo impedančne metode (meritev električnega toka). Novejši analizatorji pa,

poleg merjenja z impedančno metodo, uporabljajo še optično meritev s pretočno citometrijo v retikulocitnem kanalu. V laboratoriju se lahko srečamo s številnimi težavami pri merjenju vzorcev krvi. Pri meritvi eritrocitne vrste lahko pride do napačnih rezultatov zaradi različnih patoloških stanj, ki lahko povzročijo interference. Avtoimunske hemolitične anemije so pridobljene hemolitične anemije, pri katerih pride do vezave protiteles ali komplemента na površino eritrocitov. Glede na temperaturo, pri kateri se protitelesa vežejo na eritrocite, ločimo avtoimunske hemolitične anemije s hladnimi in toplimi protitelesi. Hladni aglutinini so v hematološkem laboratoriju naključna najdba. Pri merjenju vzorca venske krvi lahko pride do napačnih rezultatov zaradi aglutinacije eritrocitov in nastajanja eritrocitnih skupkov *in vivo* ter *in vitro*. Hladni aglutinini so protitelesa razreda IgM, ki povzročajo aglutinacijo lastnih eritrocitov pri temperaturah pod 37 °C. Pojavijo se lahko pri okužbah, limfatičnih novotvorbah ali plazmocitomu. Pri hladnih aglutininih se v hemogramu pojavi značilna kombinacija zvišanih MCH in MCHC ter znižane številčne koncentracije eritrocitov. V tem primeru je treba vzorce segreti na 37 °C in jih čim prej analizirati. Težava takega pristopa je v podaljšani izdaji rezultatov krvne slike, saj je treba vzorce inkubirati za 0,5 do 1 ure. Določeni novejši hematološki analizatorji omogočajo optično meritev eritrocitne vrste v posebnih merilnih komorah, ki so segrete na 41 °C. V študiji Roccaforte in sod. so primerjali rezultate številčnih koncentracij eritrocitov, hemoglobina, hematokrita, MCV, MCH in MCHC. Vzorce so merili z optično metodo ter jih primerjali z impedančno metodo po inkubaciji na 37 °C. Rezultati študije so, z izjemo MCHC, pokazali odlično korelacijo med obema metodama analize. Še vedno pa nobena od teh metod ne more zanesljivo rešiti vseh primerov, pri katerih so prisotni hladni aglutinini (3).

Poleg težav, ki jih prinašajo hladni aglutinini, se v laboratoriju srečujemo tudi z interferencami, ki lahko vplivajo na merjenje vzorca venske krvi. Nenormalnosti v merjenju eritrocitne vrste vodijo v napačne izračune eritrocitnih »

indeksov, kot je npr. MCHC. Zvišan MCHC je redek pojav, zato je take vzorce treba zelo podrobno pregledati in ugotoviti, ali je MCHC resnično zvišan zaradi patološkega stanja eritrocitne vrste ali pa je lažno zvišan zaradi optičnih interferenc ali aglutinacije eritrocitov. Zaradi tega so Berda-Haddad in sod. uvedli nov algoritem, pri katerem se s pomočjo optičnih (RBC-O) in impedančnih meritev (RBC) eritrocitov ter meritve hemoglobina (HGB) in izračuna hemoglobina (HGB-O) iz optične meritve v retikulocitnem kanalu ugotavlja vzrok zvišanega MCHC (lažno zvišan zaradi hemolize, ikteričnega, lipemičnega vzorca, ali resnično zvišan MCHC zaradi bolezni eritrocitne vrste). S tem algoritmom dobimo informacijo, katere parametre je treba izdati v izvidu krvne slike (impedančna ali optična meritev eritrocitov oz. meritev ali izračun hemoglobina) (4).

V laboratorijih se poleg težav v analizi zaradi optičnih interferenc pojavljajo tudi zamenjave vzorcev. Za odkrivanje nepravilnosti v analizi fazi pri hematološkem analizatorju uporabljamo dnevne kontrole, ki pa so za ugotavljanje težav v predanalizni fazi popolnoma nekoristne. Zato so v hematologiji zelo pomembni Delta Checki. Delta Check je proces odkrivanja neskladja med trenutnimi in predhodnimi rezultati za opredeljeno obdobje s pomočjo matematičnih formul. Omogočijo nam odkritje napake, preden po-

trdimo izvid. Na ta način povečamo varnost bolnikov, saj zmanjšamo možnost zamenjave vzorcev. Zelo pa so uporabni tudi pri zgodnjem odkrivanju hematoloških bolezni, saj nas opozorijo na spremembo rezultatov posameznih parametrov krvne slike v krajšem časovnem obdobju. Pri prepoznavanju zamenjave vzorcev je trenutno najboljši parameter MCV. Pri določenih vzorcih je tudi MCV nekoristen, saj se lahko rezultati MCV spreminjajo pri dializnih bolnikih z osmotskim neravnovesjem. Čeprav se Delta Checki računajo pri posameznih parametrih, trenutno ugotavljajo, da ima kombinacija več parametrov eritrocitne vrste pri izračunu Delta Checka bistveno boljšo občutljivost in specifičnost pri odkrivanju zamenjave vzorca oz. drugih predanaliznih napak, kot so neprimeren transport, neprimeren odvzem vzorca, ... (5).

Hematološki analizatorji so se v zadnjem desetletju neverjetno hitro razvili in z njihovo pomočjo veliko lažje in hitreje pridobivamo rezultate in izdajamo izvide ter tako skrajšujemo TAT. V veliko pomoč so nam tudi pri odkrivanju prikritih težav predanalizne in analizne faze. Čeprav se tehnologija razvija z neverjetno hitrostjo, pa je še vedno zelo pomemben laboratorijski delavec, ki je s svojim znanjem neprecenljiv člen v sami analizi vzorcev, saj je sposoben manevrirati in filtrirati vso to količino informacij.

## LITERATURA

1. Felkner G.M., Allen L. A., Pocock S. J., Shaw L. K., McMurray J. V., Pfeffer M. A., et al. Red Cell Distribution Width as a Novel Prognostic Marker in Heart Failure. *JACC*. 2007;1:40-47.
2. Foy H. B., Carlson J. C., Reinertsen E., Valls R. P., Lopez R. P., Palanques-Tost E., et al. Association of Red Blood Cell Distribution Width With Mortality Risk in Hospitalized Adults With SARS-CoV-2 Infection. *JAMA Netw Open*. 2020;3(9):e2022058
3. Roccaforte V., Sciarini F., Proserpio V., Buonocore R., Zavaroni E. M., Burati S., et al. Use of the reticulocyte channel warmed to 41°C of the XN-9000 analyzer in samples with the presence of cold agglutinins. *Hematol. Transfus. Cell. Ther.* 2021;43(2):147-155.
4. Berda-Haddad Y., Faure C., Boubaya M., Arpin M., Cointe S., Frankel D., et al. Increased mean corpuscular haemoglobin concentration: artefact or pathological condition? *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2017; 39:32-41.
5. Miller I. Development and Evaluation of a Logical Delta Check for Identifying Erroneous Blood Count Results in a Tertiary Care Hospital. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2015;139:1042-1047

# Laboratorijski odgovor na nove načine zdravljenja motenj strjevanja krvi

**Martina Fink**

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za hematologijo

Hemofilija je redka dedna bolezen z motnjo v strjevanju krvi. Najpogostejši sta hemofilija A, ki jo povzroča pomanjkanje faktorja strjevanja krvi VIII, in hemofilija B, pri kateri primanjkuje faktorja IX. Zbolevalo predvsem moški, ker sta gena za faktorja VIII in IX na kromosomu X, ženske so običajno prenašalke. V Sloveniji ima hemofilijo A ali B približno 250 ljudi (1, 2). Hemofilija je lahko tudi pridobljena, pri tej se razvijejo avtoprotitelesa proti faktorjem koagulacije, najpogosteje proti faktorju VIII (3). Pri zdravljenju hemofilije A in B sta najpogosteje uporabljena rekombinantna faktorja VIII in IX, ki nadomeščata pri bolniku manjkajoči faktor (2, 4). Znižane aktivnosti faktorjev koagulacije povzročajo krvavitve, ki so lahko tudi sponzane. Da bi preprečili krvavitve, je potrebno nadomeščanje manjkajočih faktorjev VIII ali IX z zdravili (1, 2, 4). V Sloveniji se za zdravljenje hemofilije A in B uporablja večina najodobnejših zdravil (Tabela 1). Ker pa imajo različna zdravila različne lastnosti, moramo njihovo aktivnost spremljati z različnimi metodami za določitev aktivnosti faktorjev koagulacije. Uporabljamo lahko enostopenjske ali pa kromogene metode. Kateri testni sistem je primeren za spremljanje aktivnosti njihovega preparata, priporočajo proizvajalci zdravil. Zdravila imajo zelo različne lastnosti, tako lahko celo različni reagenčni kompleti istega proizvajalca podajajo zelo različne rezultate (2, 4). En testni sistem lahko podceni, drugi preceni aktivnost preiskovanega faktorja koagulacije, tretji nam podaja točne rezultate. Pravilno odmerjanje rekombinantnih faktorjev je ključno za vzdrževanje učinkovite hemostaze, ki preprečuje krvavitve ob znižanih aktivnostih faktorjev koagulacije, na drugi strani pa preprečuje tudi tromboembolične zaplete ob njihovih previsokih aktivnostih (1, 2, 4).

Da medicinski laboratorij lahko pravilno določi aktivnost faktorja koagulacije (uporabi pravo metodo, testni sistem), mora vedeti, katero zdravilo bolnik jemlje in poznati lastnosti uporabljenega zdravila. Predpogoj za dostop do teh informacij je dobro sodelovanje tako z zdravniki kot s

proizvajalci zdravil. Zastopniki farmacevtskih družb nas pred sprostitevjo zdravila na slovenskem tržišču seznanijo z lastnostmi posameznega zdravila in laboratorijskimi testi, ki so primerni ali pa neprimerni za določitev aktivnosti faktorjev VIII in IX. Laboratorijski delavci se na osnovi teh podatkov odločimo, ali lahko uporabljamo že vpeljane metode, ali pa je pred začetkom uporabe zdravila treba vzpostaviti novo metodo za spremljanje zdravljenja. Ko bolnika začnejo z določenim pripravkom zdraviti, je ključna informacija, da lahko izberemo pravo metodo, podatek o zdravilu, ki ga pacient jemlje, saj le tako lahko podajamo pravilne rezultate aktivnosti faktorjev koagulacije. V Specializiranem hematološkem laboratoriju smo si pripravili interne sezname bolnikov, ki jemljejo zdravila za zdravljenje hemofilije A ali B, ki motijo običajno enostopenjsko metodo za določitev aktivnosti faktorjev VIII in IX. Pri teh so potrebne redkeje uporabljane metode, kot so kromogene ali za posamezno zdravilo prilagojene metode. Z zdravniki hematologi smo dogovorjeni, da na napotnici vedno navedejo ime preparata, ki ga bolnik jemlje. Pred kratkim smo v informacijskem sistemu uvedli kontrolni korak, ki v bolnišničnem informacijskem sistemu prepreči oddajo naročila laboratorijskih preiskav za določitev aktivnosti FVIII ali FIX, če ni vpisana bolnikova terapija. S tem zagotavljamo, da ob sprejemu vzorca poznamo vrsto zdravil, ki jih bolnik jemlje. V primeru nejasnosti še vedno lahko pokličemo naročnika. Nekatera zdravila za hemofilijo motijo druge preiskave hemostaze. Tak primer je zdravilo emicizumab (Hemlibra, Roche), ki vpliva na določitev aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (APTČ) in vse preiskave, ki temeljijo na APTČ (določitev aktivnosti FIX, FXI, FXII, lupusni antikoagulanti, neodzivnost na aktivirani protein C (APCR), določitev inhibitorjev na FVIII, FIX, FXI in FXII po metodi Bethesda), zato rezultatov teh preiskav ne podajamo oz. jih podajamo s komentarjem, da bolnik jemlje zdravilo emicizumab, ki vpliva na rezultate preiskave. Emicizumab ne moti preiskav na osnovi protrombinskega časa »

(PČ), kromogenih metod za določitev aktivnosti FVIII z govejimi proteini, imunskih metod (ELISA, D-dimer) in genetskih preiskav za določitev mutacij v genih, ki kodirajo faktorje koagulacije (5).

Nova zdravila za zdravljenje motenj v strjevanju krvi močno vplivajo na rezultate testov hemostaze, še zlasti določitev aktivnosti faktorjev koagulacije. Te vplive mora medicinski laboratorij poznati in se jih zavedati. Pomembno je sodelovanje z zdravniki in farmacevtskimi predstavniki,

ki, ki laboratorijsko osebje še pred sprostitvijo zdravila na slovensko tržišče seznanijo z lastnostmi novega pripravka. Zdravniki morajo ob naročilu preiskav za določitev aktivnosti faktorjev VIII in IX obvezno navesti podatek o zdravilih, ki jih bolnik jemlje. Laboratorijski delavci pa smo seznanjeni s posebnostmi posameznega zdravila in ob določitvi aktivnosti faktorjev koagulacije izberemo prave metode. Prav tako smo odzivni pri uvajanju novih metod za določitev aktivnosti faktorjev koagulacije, če uvajanje novih terapij to zahteva.

**Tabela 1:** Seznam zdravil za zdravljenje hemofilije A in B, ki se uporabljajo v Sloveniji in priporočene metode za določitev aktivnosti faktorjev VIII in IX. Prirejeno po viru 4.

Manjkajoči faktor	Zdravilo	Priporočena metoda za določitev aktivnosti faktorja VIII ali IX
FVIII	Advate	Enostopenjska
FVIII	Adynovate	Enostopenjska
FVIII	Elocta	Enostopenjska ali kromogena
FVIII	Esperoct	Kromogena ali ustrezna enostopenjska
FVIII	Jivi	Kromogena
FVIII	Kovaltry	Enostopenjska ali kromogena
FVIII	Novoeigt	Enostopenjska ali kromogena
FVIII	Nuwig	Enostopenjska
FVIII	Octanate	Enostopenjska
FVIII	Refacto	Prilagojena enostopenjska ali kromogena s humani proteini
FVIII	Obizur	Enostopenjska
FVIII	Hemlibra, Emicizumab	Kromogena s humanimi proteini in kromogena z govejimi proteini
FIX	Alprolix	Enostopenjska
FIX	Benefix	Enostopenjska
FIX	Refixa	Prilagojena enostopenjska



## LITERATURA

1. Benedik Dolničar M, Faganel Kotnik B, Kitanovski L, Jazbec J, Preložnik Zupan I, Anžej Doma S, et al. Nacionalna priporočila za obravnavo bolnikov s hemofilijo. *Zdrav vest*. 2017; september – oktober, 86: 422-478.
2. Tomeo F, Mariz S, Brunetta A L, Stoyanova-Beninska V, Penttila K, Magrelli A. Haemophilia, state of the art and new therapeutic opportunities, a regulatory perspective. *Brit J Clin Phrama*. 2021; 1-14.
3. Tiede A, Collins P, Knoebl P, Tietel J, Kessler C, Shima M, et al. International recommendations on the diagnosis and treatment of acquired hemophilia A. *Haematologica*, 2020, 105(7), 1791-1801.
4. Ovanosov M V, Jackson J W, Golding B, Lee T K. Considerations on activity assay discrepancies in factor VIII and factor IX products. *J Thromb Haemostas*. 2021, v tisku.
5. Jimenez-Yuste V, Auerswald G, Benson G, Dolan G, Hermans C, Lambert T, et al. Practical considerations for nonfactor-replacement therapy in the treatment of haemophilia with inhibitors. *Haemophilia*, 2021, 27(3):340-350.



# Zakaj hočemo svoje CAR-T?

**Matjaž Sever**

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za hematologijo

CAR-T celično zdravljenje spada med najnaprednejše terapije, ki jih izvajamo v medicini. Pričeli so jih razvijati konec osemdesetih let prejšnjega stoletja, klinično pa jih uporabljamo v zadnjih desetih letih. Od 2020 komercialno CAR-T celično zdravljenje s tisagenlecleucelom uporabljamo tudi v Sloveniji. Indikaciji sta akutna limfatična levkemija pri otrocih in mlajših odraslih ter difuzni velikocelični B-limfom pri odraslih. Vsi bolniki morajo imeti predhodna zdravljenja oz. opravljeno PKMC. V Evropski uniji so registrirani še drugi CAR-T za ne-Hodgkinove limfome in tudi en CAR-T za diseminirani plazmocitom. Trenutna cena zdravljenja s tisagenlecleucelom znaša okrog 240.000 EUR, zato smo se v Sloveniji odločili, da se pridružimo drugim centrom po svetu z razvojem lastnih CAR-T na trenutno najbolj razširjeni platformi za njihovo izdelavo, Miltenyi Prodigy.

Himerni antigenski receptorji so receptorski proteini, ki omogočijo limfocitom T sposobnost, da se usmerijo na specifičen protein in se tako povežejo s specifičnim antigenom na površini rakave celice. Receptorji so himerni, saj vključujejo tako domeno za vezavo antigena kot funkcijo za aktivacijo T-celic v enem receptorju. Namen izdelave CAR-T je spremeniti T-celice na način, da prepoznajo rakave celice in jih z neposrednim toksičnim delovanjem učinkovito uničijo (1).

Danes v vsakdanji klinični praksi uporabljamo tisagenlecleucel. Bolniki z DVCBL, ki so primarno rezistentni in niso sposobni nadaljevati zdravljenja z visokimi odmerki kemoterapevtikov in avtologno PKMC, imajo mediano preživetje 4,4 meseca ter enoletno preživetje 23 %. Zdravljenje s tisagenlecleucelom omogoča mediano preživetje 12 mesecev z enoletnim preživetjem 49 %. Pri bolnikih, ki so imeli popoln odziv po zdravljenju s tisagenlecleucelom (40 %), mediano preživetje ni bilo doseženo, enoletno preživetje pa je znašalo 90 %. Pri otrocih in mlajših odraslih z več predhodnimi zdravljenji je celokupni odziv na zdravljenje znašal 81 %, po 12 mesecih pa sta znašala čas do napredovanja bolezni 50 % in celokupno preživetje 76 %. Pri bol-

nikih sta sledila specifična zapleta sindrom citokinskega sproščanja in nevtoksičnost. Oba lahko uspešno zaznamo in zdravimo, pri čemer sta ključna tocilizumab in deksametazon (2, 3). Druge CAR-T, ki za sedaj še niso registrirani v Sloveniji, uporabljamo pri zdravljenju nekaterih oblik ne-Hodgkinovih limfomov in diseminiranega plazmocitoma. Raziskave pa potekajo tudi na drugih hematoloških tumorjih kot tudi pri številnih solidnih tumorjih.

Komercialni CAR-T so dostopni bolnikom znotraj registrirane indikacije, če so dostopni v različnih zdravstvenih sistemih, in če jih ti financirajo. Da bi zaobšli omenjene probleme, številne ustanove v svetu razvijajo lastna CAR-T celična zdravljenja. V Sloveniji smo k razvoju pristopili v obliki konzorcija, v katerem sodelujejo tri ustanove: Zavod za transfuzijsko medicino, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo in KO za hematologijo, UKC Ljubljana. Na vseh treh lokacijah potekajo izgradnja in pridobivanje dovoljenj za pričetek izdelave CAR-T. Na Ministrstvo za zdravje je bila oddana vloga za nov zdravstveni program, ki bo zagotavljal sredstva za vzpostavitev zdravljenja (4). Na ministrstvo za okolje in prostor – Agencijo Republike Slovenije za okolje je treba prijaviti zaprti sistem za delo in sproščanje genetsko spremenjenih organizmov (5). Na Javni agenciji za zdravila in medicinske pripomočke bomo prijavili ustrezno klinično raziskavo, za katero imamo dve možnosti: nerutinsko pripravljena zdravila za napredno zdravljenje ali klinično preizkušanje zdravil. Obe poti imata določene prednosti in slabosti, ki vplivajo na zahtevnost izvajanja raziskave, hitrost implementacije, trajanje postopkov, povezane stroške in vloge raziskovalcev (6, 7). Za izvajanje vsega je treba podpisati ustrezne pogodbe med slovenskimi partnerji ter tujima partnerjema, ki zagotavljata virusni vektor kot ključni element priprave celičnega zdravljenja. Pomemben vidik vseh prizadevanj je tudi pridobivanje kadrov z nujnimi predznanji (celična biologija, genetika, pretočna citometrija, imunologija, medicina, ...) ter njihovo nadaljnje izobraževanje. Zastavljena izvedba celičnega zdravljenja CAR-T je brez podobnega predhodnega projekta v Sloveniji in zahteva ustvarjanje novih profilov strokovnjakov.

Opisano je nujen obseg dela, ki je potreben za vzpostavitev izdelave lastnih CAR-T celičnih terapij. Z uvedbo omenjene tehnologije se bo način zdravljenja razširil še

na zdravljenje drugih hematoloških in nazadnje solidnih novotvorb, kar bo omogočilo izboljšanje obravnave vseh bolnikov z malignimi boleznimi.

## LITERATURA

- Alexander M, Culos K, Roddy J, Shaw JR, Bachmeier C, Shigle TL et al. Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy: A Comprehensive Review of Clinical Efficacy, Toxicity, and Best Practices for Outpatient Administration. *Transplant Cell Ther.* 2021; 27(7): 558-570.
- Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, Jäger U, Jaglowski S, Andreadis C, Westin JR, Fleury I, Bachanova V, Foley SR, Ho PJ, Mielke S, Magenau JM, Holte H, Pantano S, Pacaud LB, Awasthi R, Chu J, Anak Ö, Salles G, Maziarz RT; JULIET Investigators. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2019;380(1):45-56.
- Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, Verneris MR, Stefanski HE, Myers GD, Qayed M, De Moerloose B, Hiramatsu H, Schlis K, Davis KL, Martin PL, Nemecek ER, Yanik GA, Peters C, Baruchel A, Boissel N, Mechinaud F, Balduzzi A, Krueger J, June CH, Levine BL, Wood P, Taran T, Leung M, Mueller KT, Zhang Y, Sen K, Lebwohl D, Pulsipher MA, Grupp SA. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018;378(5):439-448.
- <https://www.gov.si/zbirke/storitve/postopek-obravnave-vlog-za-nove-zdravstvene-programe/> (dostop, 10.5.2021)
- <https://www.gov.si/zbirke/storitve/prijava-zaprtih-sistemov-za-delo-z-gensko-spremenjenimi-organizmi-in-delo-z-gensko-spremenjenimi-organizmi-v-zaprtih-sistemih/>
- <https://www.gov.si/zbirke/delovna-telesa/komisija-rs-za-medicinsko-etiko/> (dostop, 10.5.2021)
- <https://www.jazmp.si/humana-zdravila/klinicna-preskusanja-in-socutna-uporaba-zdravil/klinicna-preskusanja/postopek-priglasitve-in-odobritve-klinicnega-preskusanja/> (dostop, 10.5.2021)

# Prirojene motnje v strjevanju krvi z nagnjenostjo h krvavitvam – nove možnosti zdravljenja, novi izzivi

**Irena Preložnik Zupan**

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za hematologijo

Opredelevanje bolnikov z domnevno motnjo v strjevanju krvi je eden zahtevnejših postopkov v splošni hematologiji. Številni anamnestični podatki so subjektivne narave, družinska anamneza je lahko nejasna, obseg diagnostičnega testiranja pa je pogosto zelo individualiziran. Mnogi posamezniki z dednimi motnjami krvavitve poročajo o minimalni krvavitvi. Nasprotno pa mnogi posamezniki z normalno hemostazo poročajo o pretirani krvavitvi (1). Standardni postopek ocene motnje v hemostazi sestavlja: natančen pogovor z bolnikom (anamneza), usmerjen v krvavitve in/ali tromboze; klinični pregled manifestacij krvavitve pri bolniku; odločitev o vrsti laboratorijskih preiskav; usmerjeno ukrepanje.

S klinično pomembno krvavitvijo so povezane različne prirojene motnje. Pogostejše motnje hemostaze so von Willebrandova bolezen (VWD), hemofilija A in B (HA, HB), pomanjkanje faktorja XI in motnje fibrinogena. Redkejša motnje vključujejo pomanjkljivosti faktorjev XIII, XI, X, VII, V in II (protrombin), pa tudi nekatere redke kombinirane pomanjkljivosti faktorjev (1). V redni klinični praksi najpogosteje srečujemo bolnike s vWB ter hemofilijo A in B. Zdravljenje prirojene hemofilije je v zadnjih letih izrazito napredovalo in ga v kratkem predstavljamo v tem prispevku.

## HEMOFILIJA IN KLINIČNE POSLEDICE

Hemofilija je dedna bolezen. Prenaša se vezano na spolni kromosom X. Zbolijo moški, ženske so prenašalke bolezni. V približno tretjini primerov nastane mutacija na kromosomu X na novo, prvič v družini. V redkih primerih imajo lahko težave s krvavitvami tudi deklice – prenašalke hemofilije, kadar imajo zmanjšano aktivnost faktorja strjevanja krvi. Poznamo hemofilijo A, ko v krvi primanjkuje koagulacijski faktor VIII (F VIII) in hemofilijo B, ko primanjkuje faktor IX. Ločimo tri stopnje bolezni: težko obliko, z aktivnostjo faktorja strjevanja krvi pod 1 %, srednje težko, 1–5 % ter lahko obliko z aktivnostjo nad 5 % (2). Za težko obliko hemofilije so značilne ponavljajoče krvavitve v velike sklepe in mišice, ki nastanejo že ob fizioloških obremenitvah, t. i. spontane krvavitve. Z rednim

vbrizgavanjem manjkajočega FVIII/FIX v veno, običajno trikrat tedensko ali pa vsak drugi dan (t. i. preventivno zdravljenje), preprečujemo spontane krvavitve v sklepe in mišice ter mikrokrvavitve, ki lahko vodijo v trajno okvaro sklepov in invalidnost, ki je eden izmed najpomembnejših zapletov hemofilije (2). Mnogokrat je težko zagotoviti ven-ski pristop, zbrati pogum in voljo za redno aplikacijo. Ob tem se pri okoli 20–30 % bolnikov s hemofilijo A v prvih 150 aplikacijah faktorja pojavijo tudi inhibitorna alo-protelesa, ki predstavljajo resen, življenje ogrožajoč zaplet.

## NOVE OBLIKE ZDRAVLJENJA HEMOFILIJE

Z novimi oblikami zdravljenja hemofilije si na več različnih načinov prizadevamo izboljšati trenutni standardni način zdravljenja z rednim nadomeščanjem manjkajočega koagulacijskega faktorja: s podaljšanim razpolovnim časom delovanja rekombinantnih faktorjev strjevanja krvi, z genskim zdravljenjem hemofilije, ki v praksi še ni na voljo, v kliničnih študijah pa že dosega zelo dobre rezultate in z alternativnimi, novimi oblikami zdravljenja, ki uporabljajo povsem nove pristope v poteh hemostaze (3–5).

### Rekombinantni faktorji strjevanja krvi s podaljšanim razpolovnim časom

Razpolovni čas FVIII v plazmi je 10 do 12 ur, FIX pa 16 do 18 ur. Faktorji s podaljšanim razpolovnim časom lahko zmanjšajo pogostost injiciranja in/ali povečajo najnižjo raven pred naslednjo aplikacijo. Uporabljajo se različne tehnike za upočasnitev razgradnje faktorja iz plazme, kot so fuzijske tehnike ali pegilacija (kovalentno vezanje polietilen glikola – PEG na določenih točkah molekule FVI-II). Razpolovni čas FVIII je omejen z vezavo na von Willebrandov faktor (vWF) z razpolovnim časom okoli 18 ur. Da zmanjšamo pogostost odmerjanja s trikrat na dvakrat tedensko, pri čemer se ohrani raven faktorja strjevanja, mora biti razpolovni čas vsaj 1,3-krat večji od običajnega FVIII (3). Podaljšana razpolovna doba FIX je 2,4- do 4,8-krat daljša od običajne, kar omogoča učinkovito preventivno zdravljenje z aplikacijami faktorja na en do dva tedna. Varnostni profil teh zdravil je opisan kot primerljiv s standardnim zdravilom FIX (6). Pegilirana zdravila so dovoljena samo za bolnike, starejše od 12 let (7).

### Gensko zdravljenje hemofilije

Hemofilija je na nek način idealna bolezen za gensko zdravljenje. Običajno gre za mutacijo enega gena in že minimalen porast aktivnosti manjkajočega faktorja strjevanja (npr.  $\geq 5\%$ ) pomembno izboljša klinično sliko bolnika, pri čemer iz težke oblike bolezni naredimo lahko. To bi dosegli že po enkratni infuziji rekombinantnega, adenovirusnega vektorja (AAV), ki vsebuje gen za manjkajoči koagulacijski faktor. AAV se trenutno uporabljajo kot virusni prenašalci pri *in vivo* genskem zdravljenju, kažejo močan jetrni tropizem, virusni genetski material pa se ne integrira v genom gostiteljske celice (8, 9).

### Alternativne, nove oblike zdravljenja hemofilije

Novi pristopi k zdravljenju hemofilije ne uporabljajo več nadomeščanja manjkajočih faktorjev strjevanja, temveč se nova zdravila vključujejo v koagulacijsko kaskado na drugih mestih oziroma preprečujejo delovanje naravnih zaviralcev koagulacijske kaskade (3, 4).

Prvo takšno zdravilo, ki ga že imamo na slovenskem tržišču, je **emicizumab**. Gre za rekombinantno, humanizirano, bispecifično monoklonalno protitelo, ki v poti strjevanja krvi poveže aktivirani faktor IX in X, ter tako nadomesti funkcijo manjkajočega aktiviranega faktorja VIII, ki je nujno potreben za učinkovito hemostazo. Emicizumab nima strukturne sorodnosti s faktorjem VIII in tako nanj ne delujejo inhibitorna protitelesa proti F VIII, prav tako tudi ne povzroči njihovega razvoja. Lahko se torej učinkovito daje hemofilikom z inhibitornimi protitelesi kot hemofilikom brez njih. Emicizumab je prvo zdravilo za hemofilijo A, ki ga ni treba dajati v obliki intravenske infuzije, ampak ga apliciramo v obliki podkožne injekcije. Zdravilo vnaša v vsakodnevno klinično prakso tudi pomembno novost zaradi vpliva na osnovne teste strjevanja krvi. Povzroči lažno skrajšanje aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (aPTČ). Za nadzor aktivnosti FVIII kot merjenje titra inhibitornih protiteles so potrebni kromogeni testi in uporaba govejih koagulacijskih beljakovin, na katere emicizumab nima vpliva.

Druga nova zdravila zavirajo inhibitorje koagulacijske kaskade. Z zaviranjem negativnih regulatorjev koagulacije se poveča količina trombina in s tem zaustavi ali prepreči krvavitve. Ti pristopi vključujejo majhno motečo RNA (siRNA), ki pred translacijo razgradi mRNA, ki kodira ATI-II. Druga zdravila zavirajo poti tkivnega faktorja (TFPI) z nevtralizirajočimi protitelesi, tretje usmerja aktiviran protein C. Predklinični podatki kažejo, da bodo ti pristopi uporabni za zdravljenje bolnikov s hemofilijo A ali B, z inhibitorji ali brez njih, in morda tudi bolnikov z drugimi redkimi motnjami krvavitve. Tudi ta zdravila bodo dana pod kožo v tedenskih intervalih ali redkeje. »

## IZBIRA PROFILAKTIČNEGA ZDRAVLJENJA

Izbira profilaktičnega zdravljenja je kompleksna tudi za hematologe, zato je treba odločitve sprejemati ob posvetovanju s strokovnjakom za hemofilijo. Vsi razpoložljivi profilaktični izdelki (Tabela 1) lahko povzročijo zadovoljivo hemostazo. Vendar pa imajo različne odzive bolnikov, različne varnostne profile (tveganja razvoja zaviralcev, obremenitve in stroški) in različne značilnosti zdravila (razpolovna doba zdravila, učinki na spremljanje).

Individualno se odločamo med nadomeščanjem faktorjev in emicizumabom. Vrsto faktorja strjevanja izbiramo na podlagi bolnikovih okoliščin in potreb, po odprti razpravi z bolnikom o specifičnih podatkih za posamezni izdelek ter ciljih in preferencah samega bolnika.

Ko ugotovimo, kateri izdelek je najbolj primeren za pacienta, se po najboljših močeh trudimo pridobiti ta izdelek, kar lahko vključuje posredovanje podatkov in utemeljitve tretji osebi, plačniku.

**Tabela 1:** Faktorji strjevanja krvi in nefaktorsko zdravljenje hemofilije A in B v Sloveniji. SHL - standardni razpolovni čas, EHL - podaljšan razpolovni čas.

HEMOFILIJ A	HEMOFILIJ B
Rekombinantni FVIII, SHL KOVALTRY, REFACTO AF, NOVOEIGHT, NUWIQ	Rekombinantni FIX, SHL BENEFIX
Rekombinantni FVIII, EHL JIVI, ELOCTA, ESPEROCT, ADYNOVI	Rekombinantni FIX, EHL REFIXIA, ALPROLIX
Nefaktorsko nadomestno zdravljenje HEMLIBRA	

## LITERATURA

- Mannucci PM. Rare inherited coagulation disorders. Available from: [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com). Literature review current through: Oct 2021.
- Srivastava A, Santagostino E, Dougali A, et al. WFH guidelines for the management of Hemophilia, 3rd edition. *Hemophilia* 2020; 00:1-158.
- Miesbach W, Schwäble J, Müller MM, Seifried E. Treatment options in haemophilia. *Dtsch Arztebl Int* 2019; 116: 791–8.
- Rob Peters, Tim Harris. Advances and innovations in haemophilia treatment. *Nature Reviews* 2018; 17: 493-508.
- Mahlangu J, Young G, Hermans C, Blanchette V, Berntorp E, Santagostino E: Defining extended half-life rFVIII-A critical review of the evidence. *Haemophilia* 2018; 24: 348–58.
- Mahlangu JN: Updates in clinical trial data of extended half-life recombinant factor IX products for the treatment of haemophilia B. *Ther Adv Hematol* 2018; 9: 335–46.
- Mannucci PM. Benefits and limitations of extended plasma half-life factor VIII products in hemophilia A. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2020. In progress.
- Flotte TR, Carter BJ: Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther* 1995; 2: 357–62.
- Nathwani AC. Gene therapy for hemophilia. *ASH Education book* 2019.

# Pediatrična populacija – najbolj ranljiva skupina svetovnega prebivalstva

**Danijela Furlan**

Splošna bolnišnica Novo mesto, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko

## RAZVOJNA OBDOBJA OD ROJSTVA DO ODRASLOSTI

**DOJENČKI:** Prvo leto po rojstvu otroke imenujemo dojenčki. V tem obdobju se kažejo mnoge dobro razvite lastnosti, kot so občutek za dotik, sluh, voh. Dobro znajo izraziti svoje potrebe z jokom. To je obdobje hitre rasti, rastejo celo hitreje kot v obdobju pubertete. V povprečju so dvakrat večji, kot so se rodili, in trikrat težji kot ob rojstvu (1).

**OTROŠTVO:** Malček je otrok od enega do treh let. V tem obdobju se otroci učijo hoditi in dosežejo še veliko drugih mejnikov. Pri štirih letih jih večina zna teči, plezati po stopnicah in tvoriti preproste stavke. Pri petih prepoznajo črke, se učijo voziti kolo in igrati druge igre. Pri šestih izgubijo mlečne zobe, govorijo tekoče, učijo se bra-

ti in pisati, razvijajo prijateljstva. V kasnejših otroških letih (pozno otroštvo) se nadaljuje mentalni, čustveni in socialni razvoj (1).

**PUBERTETA:** Je obdobje spolnega odraščanja, pokažejo se izrazitejšje razlike med spoloma (1).

**ADOLESCENCA:** Je obdobje med začetkom pubertete in odraslostjo. Je tudi čas velikih duševnih, čustvenih in socialnih sprememb. Adolescenti razvijejo sposobnost razmišljati abstraktno; poskušajo biti manj odvisni od staršev; preživijo več časa v družbi vrstnikov; začnejo razvijati intimne odnose (1).

## RANLJIVOST PEDIATRIČNE POPULACIJE

Zaradi neenakomernega napredka otroci še vedno trpijo zaradi smrtnosti in obolevnosti, ki ju je mogoče preprečiti. Izpostavljenost podnebnim spremembam predstavlja visoko stopnjo tveganja za zdravje otrok po vsem svetu. WHO ocenjuje, da je več kot tretjina otroških smrti posledica ško-

dljive izpostavljenosti onesnaženemu zraku, neustreznim sanitarnim razmeram, mrazu in vročini, vlagi in plesni, nesrečam v gospodinjstvu in okoljskim toksinom, kot so nevarna mesta v bližini smetišč, železniških prog ali cest (2). »

## PATOFIZIOLOŠKA DOGAJANJA V OTROŠTVU IN DOBI ODRAŠČANJA (3)

### Sindrom nenadne dojenčkove smrti

SIDS (Sudden infants death syndrom) predstavlja 20 % smrti novorojenčkov v obdobju od enega meseca do enega leta. Največ tovrstnih smrti se zgodi okoli petega meseca starosti, doma ponoči med spanjem.

### Motnja v rasti

Je stanje, ko otrok ne pridobiva zadovoljivo teže. Splošni razlogi so lahko pomanjkanje hrane ali številne pomanjkljivosti prebavil.

### Motnje prehranjenosti

V razvitih deželah je najpogostejša tovrstna motnja debelost. V nerazvitih državah se pojavlja podhranjenost zaradi pomanjkanja hrane in vitaminov, ki se kaže v številnih boleznih (rahitis, skorbut, beriberi, lezije na koži, očesne nepravilnosti, zaostanek v rasti, dermatitis).

### Klasične infekcijske bolezni v otroštvu

Infekcijske bolezni so pri otrocih brezštevne, vendar pa so nekatere dobile sinonim "otroške bolezni", npr. ošpice, rdečke, mumps in še nekatere virusne bolezni.

### Respiratorne motnje

Navadni prehlad je najbolj pogosta respiratorna bolezen pri otrocih, pogosto se pojavljajo tudi vnetje mandeljnov, srednjega ušesa in žrela, astma, alergijski rinitis (najpogostejša alergijska motnja v otroštvu).

### Srčnožilne motnje

Prirojena srčna napaka se prišteva med najpogostejše tovrstne motnje. Med pridobljenimi motnjami pa prednjači revmatska vročica (beta-hemolitično streptokokna infekcija grla), ki se pojavi največkrat v obdobju od petih do petnajstih let. Perikarditis in miokarditis (vnetje srčne ovojnice in mišice) sta najpogostejše posledici revmatske vročice. Večina motenj srčnega utripa in ritma v otroštvu je benigna, z izjemo paroksizmalne atrijske tahikardije, za kate-

ro je značilno, da bitje srca za trenutek obstane ali pa je pospešeno (celo do 300 udarcev na minuto).

### Krvne (hematološke) bolezni

Najpogostejša in najbolj običajna anemija pri dojenčkih in otrocih je anemija zaradi pomanjkanja železa. Leukemija v otroški populaciji se pojavlja v štirih primerih na 100.000 otrok, največ v starostnem obdobju od dveh do štirih let. Najpogostejša je limfoblastna leukemija.

### Motnje prebavil in jeter

Abdominalna bolečina, eden najpogostejših simptomov v zgodnjem otroštvu, običajno ni povezana z boleznijo, temveč je lahko psihosomatske ali prebavne narave. Bolečino lahko povzročijo vnetje slepiča, manjši predmeti, ki jih mali otroci vtaknejo v usta in pogoltnejo, intoleranca na hrano, ki povzroči bruhanje in drisko.

### Ledvične motnje in motnje urinarnega trakta

Okužbe urinarnega trakta so pogostejše pri deklicah. *E. Coli* je odgovorna za 80 % vseh primerov. Nefrotski sindrom je skupina simptomov, ki so posledica katerekoli ledvične bolezni, z značilno velikim izločanjem proteinov v urinu. Nepravilnosti, ki so značilne za renalno-tubularno funkcijo, so poznane kot Fanconijev sindrom (namesto absorpcije prehajajo v urin glukoza, aminokisliline, urat, fosfor, bikarbonati).

### Bolezni živčnega sistema

Cerebralna paraliza se kaže v nezmožnosti gibanja in telesni drži. V večini primerov gre za trajne poškodbe možganov in ozdravitev ni možna. Možganski tumorji so drugo najpogostejše maligno obolenje, takoj za leukemijo. Vsaj 5 % otrok ima vročične napade vsaj enkrat v življenju in so povezani z visoko vročino. Epilepsija prizade ne okoli 0,5 % otrok. V prvih petih letih življenja se pojavi meningitis pri 8 % otrok. Večina je virusnega izvora – virus mumpsa, ki ne povzroča trajnih okvar.

»



## Kožna obolenja

So običajna v otroštvu (kožna znamenja, izpuščaji). Ekcem se kaže v pordelosti kože in izpuščajih ter z izrazitim srbenjem. Glivične okužbe kože so tudi zelo pogoste. Ustne gobice (male bele pike) prizadenejo dojenčke in so posledica delovanja glive *candida albicans*. Bradavice so najbolj običajna virusna kožna okužba v otroški dobi. Številni paraziti (uši, garje) lahko povzročajo okuženost kože.

## Nesreče (nezgode)

V razvitih državah povzročijo nesreče (predvsem prometne) več smrti in pohabljenosti med otroki kot katerakoli druga bolezen. Nesreče doma (opekline, padci) predstavljajo četrtno smrti ali trajnih poškodb. Naključne zastrupitve so zelo običajne predvsem med drugim in četrtem letom starosti (vse vtaknejo v usta!). Zastrupitev s svincem

postaja čedalje bolj pogosta širom sveta.

## Zloraba in zanemarjanje otrok

Spekter zlorab je širok. Od fizičnih (zlomi, modrice), do čustvenih in spolnih zlorab, namernih zastrupitev, namišljenih "bolezenskih" prizadetosti, da so bolni (Munchausen sindrom) in M. sindrom po namestniku – starši namerno povzročijo bolezen (zastrupitev z veliko količino soli; materina kri v urinskem vzorcu otroka).

## Psihološke motnje

Glavobol, bolečine v nogah in v želodcu so simptomi, ki so značilni za stres pri otrocih. Pogosta motnja je hiperaktivnost, ko se otroci težko osredotočijo samo na eno aktivnost za daljši čas, so nenehno v gibanju in potrebujejo zelo malo spanca.

# SKRB ZA ZDRAVJE PEDIATRIČNE POPULACIJE

## Presejalno testiranje novorojenčkov

### ZDA

Za vse novorojenčke izvajajo genetsko in presnovno presejanje ter presejanje bilirubina in vrojenih srčnih bolezni (4).

### EVROPA

V Veliki Britaniji so leta 1960 prvi pričeli z neonatalnim presejanjem na fenilketonurijo z vpeljavo vzorčenja krvnih madežev. Razvoj laboratorijskih tehnik (tandemska masna spektrometrija, molekularne tehnike) sedaj omogoča analizo 40–50 vrojenih motenj iz enega krvnega madeža (5).

V Italiji je neonatalno presejanje zakonsko obvezno. Trenutno izvajajo 35 presejalnih testov, v Avstriji 26, na Hrvaškem 8. Večina laboratorijev uporablja imunokemične metode in tandemsko masno spektrometrijo (5).

### SLOVENIJA

Presejalno testiranje novorojenčkov za vrojene bolezni zajema (6):

- kongenitalno hipotireozo,
- fenilketonurijo (PKU),
- bolezen javorjevega sirupa (MSUD),

- izovalerično acidemijo (IVA),
- glutarično acidemijo tip I (GAI),
- glutarično acidemijo tip II (GAII),
- pomanjkanje zelo dolgoverižne acil-CoA dehidrogenaze (VLCAD),
- pomanjkanje dolgoverižne 3OH-CoA dehidrogenaze (LCHAD),
- pomanjkanje srednjeverižne acil-CoA dehidrogenaze (MCAD),
- propionsko acidemijo (PA),
- metilmalonsko acidemijo (MMA),
- pomanjkanje karnitin palmitoiltransferaze I (CPTI),
- pomanjkanje karnitin palmitoiltransferaze II (CPTII),
- motnjo vnosa oziroma transporta karnitina (CUD),
- pomanjkanje holokarboksilazne sintaze (MCD),
- pomanjkanje  $\beta$ -ketotiolaze ( $\beta$ KT),
- pomanjkanje 3-metilokrotonil-CoA karboksilaze (3-MCC) in
- tirozinemijo tip 1 (TYRI).

»

## Presejalno testiranje otrok v različnih starostnih obdobjih

### ZDA

- Presejanje sluha (redni in periodični pregledi za vse otroke od 4 do 21 let).
- Presejanje vida – otroci, pri starosti 5, 6, 8, 10, 12 in 15 let).
- Presejanje razvoja in vedenja – razvojni pregled pri starosti 9, 18 in 30 mesecev ter pregled ob motnjah avtističnega spektra pri starosti 18 in 24 mesecev.
- Presejanje na pomanjkanje železa – pri starosti 4 in 12 mesecev.
- Presejanje na zastrupitev s svincem – pri otrocih, starih od 1 do 5 let. (4)

### SLOVENIJA

Pravilnik za izvajanje preventivnega zdravstvenega varstva na primarni ravni (6) določa:

1. zdravstveno varstvo dojenčkov in otrok do dopolnjenega 6. leta starosti:

- sistematični preventivni pregledi v starosti 1, 3, 6, 9, 12 in 18 mesecev ter 3 let in 5 let,
- namenski pregledi (pred vstopom v vrtec, pred odhodom na organizirano zdravstveno letovanje, ob pojavu epidemij nalezljivih bolezni).

2. zdravstveno varstvo šolskih otrok in mladine do dopolnjenega 19. leta starosti:

- sistematični preventivni pregledi pred vstopom v osnovno šolo; v 2., 4., 6. in 8. razredu osnovne šole,
- sistematični pregledi dijakov v 1. in 3. letniku srednje šole,
- sistematični pregledi izven rednega šolanja v 18. letu starosti.

Dodatna obravnava razvojno in vedenjsko motenih otrok.

## BOLEZEN SODOBNEGA ČASA – OTROŠKA DEBELOST

### SVET

Število debelih otrok in mladostnikov se je z 11 milijonov leta 1975 povečalo na 124 milijonov v letu 2016, nadaljnjih 216 milijonov otrok pa je imelo prekomerno telesno težo (340 milijonov oziroma 4,6 % od 7,4 milijarde svetovne populacije) (2).

### SLOVENIJA

Slovenija ima vpeljan nacionalni sistem spremljanja in nadzora, tako imenovani SLOfit že od leta 1987, ki zbira podatke o indeksu telesne mase otrok, kožni gubi in rezultate osmih motoričnih testov. Sistem pokriva približno 90 % populacije, stare med 6 in 19 let z velikostjo vzorca med 180.000 in 190.000 letno (7). Podatki SLOfit iz leta 2014 kažejo, da je bilo debelih ali pa s prekomerno telesno težo 26,4 % dečkov (48.880) in 22,2 % deklic (41.070) (7).

Prekomerna telesna teža oziroma debelost je v otroški in mladostniški dobi lahko dejavnik tveganja za bolezni, kot so (7):

- kardio-metabolični in kardiovaskularni zapleti

(obstaja povezava),

- sladkorna bolezen tipa I (obstaja povezava),
- sladkorna bolezen tipa II (so trdni dokazi),
- astma (obstaja povezava),
- ortopedske in mišično-skeletne težave (obstaja povezava),
- motnje spanja in težave s spanjem (obstaja povezava – apneja),
- depresija in slabo razpoloženje (obstaja povezava).

Debelost v otroštvu je povezana tudi z boleznimi v odrasli dobi, in sicer (7):

- sladkorna bolezen tipa II (močna povezava),
- koronarna srčna bolezen in ishemična bolezen srca (močna povezava),
- celokupni holesterol, LDL in HDL holesterol in trigliceridi (trdni dokazi za zvišane TG),
- inzulinska rezistenca (obstaja povezava),



- karotidna ateroskleroza arterij (obstaja povezava),
- povišan krvni tlak (trdni dokazi),
- nealkoholna zamaščenost jeter (NAFLD) (obstaja tveganje),
- mišično-skeletne težave (dokazana povezava za bolečine v kolenu in artritis).

Zaradi obvladovanja situacije so odgovorne ustanove napisale Strateški programski okvir ukrepov za zmanjševanje otroške debelosti. Na NIJZ zagovarjajo implementacijo

sistemskih ukrepov, opisanih v Resoluciji o Nacionalnem programu prehrane in telesne dejavnosti 2015–25, ki otrokom omogočajo življenje v okoljih, v katerih bodo lahko razvijali zdrave prehranske in gibalne navade (7).

Ministrstvo za zdravje pa je v dialogu z vsemi deležniki v Sloveniji, tudi s predstavniki živilsko predelovalne industrije in oglaševalcev, pripravilo Prehranske smernice za oblikovanje pravil ravnanja za zaščito otrok pred nepriemernimi komercialnimi sporočili (MZ, 2016) (7).

## SRČNOŽILNE BOLEZNI PRI OTROCIH

V posameznih primerih se zdravniki težko odločijo, ali je dihalna stiska posledica srčnega popuščanja ali pljučne bolezni. Pri odraslih pogosto uporabljajo določitev BNP, ki jim pomaga razlikovati med tema dvema stanjema (8). Avtorji preglednega članka (8) navajajo, da se je določanje BNP/NT-proBNP v kliničnih primerih domnevnega srčnega popuščanja izkazalo za dragoceno tudi pri otrocih. Te vrednosti pa niso primerljive z vrednostmi za odraslo populacijo (9). Laboratorijski rezultati so dobili veljavo šele letos, ko so bile v obsežni študiji (9), izvedeni na zdravi populaciji kanadskih otrok, določene referenčne in mejne vrednosti (cut-off) za NT-proBNP in visoko občutljivi troponin T (TnT-hs) (9). V študijo je bilo vključenih 484 zdravih otrok in adolescentov med 0 in < 19 let. Vzor-

ci so bili razdeljeni v tri starostne skupine za hs-TnT: od 0 do < 6 mesecev; od 6 mesecev do < 1 leta; od 1 leta do < 19 let; najvišje vrednosti je imela prva starostna skupina. Za NT-proBNP sta bili samo dve starostni skupini: od 0 do < 1 leta in od 1 leta do < 19 let, prav tako z najvišjimi koncentracijami pri dojenčkih do enega leta (9).

Izsledki te študije sedaj pomagajo pediatrom pravilno "ovrednotiti" kardiovaskularne bolezni (akutni miokarditis in dilatativno kardiomiopatijo) pri otrocih in adolescentih. To so potrdili tudi naši laboratorijski rezultati na izbranih kliničnih primerih, ki so bili obravnavani na Pediatričnem oddelku SBNM v letošnjem letu.

## LITERATURA

1. Kliegman R.K., et al. Nelson Textbook of pediatrics. 19th ed. Elsevier Science Health Science Division, Philadelphia, Pennsylvania; 2011; 26-40.
2. Costello A. Naimy Z. Maternal, newborn, child and adolescent health: challenges for the next decade. *Int Health* 2019; 11; 349–352.
3. Disorders of later infancy and childhood. Sudden infant death syndrome (SIDS). Dosegljivo na: <https://www.britannica.com/science/childhood-diseases-and-disorders/Disorders-of-later-infancy-and-childhood>
4. Kelly R. N., Drutz E. J. in Torchia M. M. Screening tests in children and adolescents. Dosegljivo na: <http://www.uptodate.com/contents/screening-tests-in-children-and-adolescents>
5. Loeber J. G. et al. Neonatal screening in europe revisited: an ISNS perspective on the current state and developments since 2010. *International journal of neonatal screening*, 2021; 7/15, 1-21.
6. Navodilo za izvajanje preventivnega zdravstvenega varstva na primarni ravni. Dosegljivo na: <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina?urlurid=1998807>
7. Korošec A, Gabrijelčič Blenkuš M in Robnik M. Otroška debelost v Sloveniji – strokovna izhodišča za stroškovno oceno. Dosegljivo na: [https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/publikacije-datoteke/stroski\\_otroske\\_debelosti\\_0.pdf](https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/publikacije-datoteke/stroski_otroske_debelosti_0.pdf)
8. Fox M. S. B-Type Natriuretic Peptide (BNP) use in Children. Dosegljivo na: <https://pedemmsorsels.com/b-type-natriuretic-peptide-bnp-use-in-children/2018>
9. Lam E. et al. Normative values of high-sensitivity cardiac troponin T and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in children and adolescents: a study from the CALIPER cohort. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 2021; 6(2); 344-53.

# IgE alergije in prikaz kliničnih primerov alergij pri otrocih

**Tadeja Dežman**

Splošna bolnišnica Novo mesto, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko

## UVOD

Poznamo štiri tipe preobčutljivostnih reakcij. Preobčutljivost tipa I je takojšnja oziroma s protitelesi IgE posredovana reakcija, ki jo imenujemo **alergija** (1). Je kronično klinično stanje, ki vključuje nenormalen imunski odgovor na običajno neškodljive antigene (alergene) (2).

Ob prvem stiku z alergenom se razvijejo protitelesa IgE, ki se vežejo na visokoafinitetne receptorje na mastocitih in bazofilcih. Ob ponovnem stiku z istim alergenom pride do navzkrižne povezave vezanih IgE, kar povzroči degranulacijo celic in sproščanje mediatorjev, ki so odgovorni za nastanek kliničnih simptomov (2, 3). Alergije zajemajo širok spekter pojavnih oblik in prizadenejo kožni, dihalni in prebavni sistem (1).

## PREVALENCIA

Alergijske bolezni so med najbolj prevalentnimi na svetu (4). Prizadenejo približno 30 % svetovne populacije (5). V zahodnih državah alergije na hrano prizadenejo približno 8 % otrok (6) in 2–3 % odraslih (4). Prevalenca prehranskih alergij narašča tudi v drugih delih sveta (Afrika, Azija), hitreje v urbanih kot v ruralnih območjih (2).

## TOLERANCA NA HRANO

V ozkem črevesju dendritične celice predstavljajo antigene hrane in spodbujajo diferenciacijo naivnih T-celic v regulatorne T-celice (Treg). Antigene hrane predstavljajo tudi limfocitom B v mezenteričnih bezgavkah, ki začnejo proizvajati sluznična protitelesa IgA. S tem se vzdržuje specifična imunska toleranca. Sproščanje proinflammatoryh citokinov iz črevesnih epitelialnih ali kožnih celic sproži prekinitve tolerance. Pod vplivom teh citokinov antigen predstavitevne celice sprožijo diferenciacijo naivnih limfocitov v Th2 namesto v Treg. Th2 izločajo IL-4, ki v limfocitih B spro-

ži preklop v izdelavo protiteles IgE ter pomnožitev mastocitov in bazofilcev (7).

Obstaja več hipotez, s katerimi skušajo razložiti porast števila prehranskih alergij. Najmočnejši dejavnik tveganja za razvoj alergije na hrano naj bi bil kožni ekcem v obdobju dojenčka (6). Higijenska hipoteza podpira zaščitni učinek zgodnjega stika z mikrobi (2). Razvoj tolerance na hrano naj bi spodbujala tudi zadosten nivo vitamina D ter raznovrsten črevesni in kožni mikrobiom (8).

## DIAGNOSTIKA ALERGIJ

Prva koraka pri postavitvi diagnoze sta natančna anamneza in klinični pregled (1). Na alergijo se klinično posumi, če se preobčutljivostna reakcija pojavi v 30 do 120 minutah po izpostavitvi alergenju. Senzibilizacijo na alergen potrdimo s prisotnostjo specifičnih IgE protiteles (SPE) *in vivo* ali *in vitro*. Za obvladovanje alergije je ključna identifikacija povzročiteljskega alergena. Izbira alergenov za testiranje temelji na anamnezi. Otroci, mlajši od dveh let, so senzibilizirani na manjše število alergenov v primerjavi s starejšimi otroci in odraslimi. Najpogostejši prehranski alergeni pri dojenčkih in majhnih otrocih so kravje mleko, kokošja jajca, arašidi, oreščki, soja, pšenica. Malčki so lahko senzibilizirani tudi na pršico, plesni, živali, s katerimi so pogosto v stiku in le redko na cvetni prah (9).

## *In vivo*: kožni testi

Z vbodom alergena v kožo se pri predhodno senzibiliziranem posamezniku sproži alergijska reakcija. Velikost mehurčka se interpretira glede na pozitivno (histamin) in negativno (fiziološka raztopina) kontrolo, ker je reaktivnost kože posameznikov različna (1).

»

## In vitro

S serološkimi testi zaznamo proste IgE v serumu in dokažemo tip preobčutljivostne reakcije (2, 9).

## Celokupni IgE (TIE)

Od vseh razredov imunoglobulinov je koncentracija IgE v serumu najnižja, vendar pa so protitelesa IgE stalno prisotna v zdravih tkivih, vezana na visoko afinitetne receptorje na površini celic. Fiziološka funkcija endogenih IgE je še nepojasnjena, imeli naj bi vlogo pri obrambi gostitelja pred škodljivimi snovmi iz okolja in paraziti (10).

Serumske koncentracije TIE so starostno specifične. IgE ne prehaja placente (11). V popkovnični krvi so vrednosti zelo nizke, nato pa naraščajo do 15. leta, podobno kot serumski IgA (9). Pri nobenem drugem razredu imunoglobulinov ni prisoten takšen porast normalnih vrednosti v času življenja (12). S staranjem koncentracija TIE upada (9).

Nivo celokupnih serumskih IgE je skupek vseh specifičnih IgE molekul. Uporabnost TIE je pri diagnostiki alergij omejena. Zvišane koncentracije so lahko prisotne tudi pri okužbi s paraziti, pri imunskih pomanjkljivostih, okužbi z Epstein Barr virusom, revmatoidnem artritisu, kadicah, onkoloških boleznih (1, 13). Približno polovica bolnikov z alergijo ima normalno koncentracijo TIE v serumu (11).

## Specifični IgE

IgE protitelesa, ki nastanejo proti posameznim alergenom, imenujemo specifična IgE protitelesa (SPE) (1). Prisotnost SPE je dokaz, da je bolnik senzibiliziran na alergen. Poleg senzibilizacije pa morajo biti za postavitev diagnoze prisotni tudi simptomi ob izpostavitvi alergenu, zato morajo biti rezultati testiranja vedno interpretirani skupaj s klinično sliko (13).

Identificirane so številne molekule posameznih alergenih proteinov (npr. alergen breze *Bet v* (*Betula verrucosa*) vsebuje 8 molekul) (14). Vzpostavljena je sistematična nomenklatura in podatkovna baza znanih alergenih proteinov (<http://www.allergen.org>) (2, 15).

Diagnostični reagenti so lahko ekstrakti alergenov iz naravnih virov ali pa posamezne alergene molekule, pridobljene z biokemijsko izolacijo iz naravnih virov. Z uporabo metod molekularne diagnostike (*Component Resolved*

*Diagnosis*) je mogoča tudi priprava rekombinantnih alergenih molekul (molekularnih komponent) (14).

Pri **singleplex analizi** SPE merimo imunokemično. Koncentracije SPE v serumu podajamo v razredih. Štirje največji proizvajalci (ThermoFisher, Siemens, Hycor, Euroimmun) ponujajo različno število alergenih ekstraktov in molekularnih komponent (9, 16).

Na mikromrežah lahko sočasno ugotavljamo prisotnost SPE proti številnim alergenom (**multiplex**). V Avstriji so nedavno razvili ALEX (ang. *Allergen Explorer*), kjer so na mikromrežo nanese ali alergeni v obliki nanodelcev. Mikromreže so lahko uporabno diagnostično orodje za določitev senzibilizacijskega profila, identifikacijo navzkrižno reaktivnih, nepredvidenih in visoko tveganih alergenov, vendar je interpretacija dobljenih rezultatov zapletena (9).

## Celični testi

Celični testi se zaenkrat uporabljajo le v raziskovalne namene. Rezultati testov korelirajo z resnostjo alergijske reakcije. Pri testu aktivacije bazofilcev vzorec krvi inkubirajo z alergenom. Na aktiviranih bazofilcih se poveča izražanje označevalcev CD203 in CD63 (13).

## ALERGENI IN NAVZKRIŽNA REAKTIVNOST

Alergeni pripadajo različnim proteinskim družinam (14). Težje alergijske reakcije pogosto sprožijo alergeni, odporni na visoke temperature in prebavne encime (9).

Navzkrižno reaktivne alergene molekule pri posamezniku, ki je predhodno senzibiliziran na primarni alergen, sprožijo blago alergijsko reakcijo. Do navzkrižne reaktivnosti pride, ko je podobnost med molekulami večja od 70 %. Kosenzibilizacija je hkratna preobčutljivost na alergene iz različnih virov in ni posledica navzkrižne reaktivnosti (14).

Pri starejših otrocih in odraslih je do 60 % prehranskih alergij posledica navzkrižnih reakcij na inhalatorne alergene (sekundarne prehranske alergije). Najpogostejši klinični znak je kontaktna urtikarija ustno-žrelnega predela. V Evropi je visoka prevalenca sekundarnih prehranskih alergij, ki so posledica navzkrižnih reakcij na pelod breze (glavni alergen *Bet v* 1). Pogoste so navzkrižne reakcije z alergenimi jabolka (*Mal d* 1), češnje, hruške, breskve, zelene, korenja, lešnika, soje, kivija, arašida (*Ara h* 8) (15).

»

## ZDRAVLJENJE ALERGIJ

Zdravljenje alergij poteka z izogibanjem alergenom. Način zdravljenja simptomov je imunoterapija, katere cilj je preusmeritev iz proizvodnje protiteles IgE v IgG (2). Za zdravljenje astme je na voljo zdravilo Omalizumab, anti-IgE protitelo (5).

## KLINIČNI PRIMERI ALERGIJ PRI OTROCIH

### Interpretacija imunokemičnih testov

Pri pacientih z višjim nivojem protiteles obstaja večja verjetnost za pojav simptomov ob izpostavitvi alergenom. Pražne vrednosti, nad katerimi večina pacientov razvije klinične simptome, niso določene. S simptomi ob izpostavitvi alergenom so običajno povezane šele koncentracije SPE  $\geq$  III razreda ( $\geq 3,5$  kE/L), medtem ko je asimptomatska senzibilizacija lahko prisotna pri koncentracijah SPE  $<$  III razreda. Če je rezultat izrazito pozitiven (razred VI), anamneza kaže na ta alergen in je alergen dobro opredeljen, lahko običajno postavimo diagnozo brez nadaljnjih preiskav. Negativen rezultat imunokemičnega testiranja v primeru, da anamneza kaže na alergen, ne izključi alergije (13).

Mehanizmi, ki regulirajo nastajanje specifičnih IgE protiteles, še niso povsem raziskani (17). Izpostavitve alergenom sproži prehodni porast koncentracije IgE, nastajanje IgE protiteles pa se nadaljuje tudi v odsotnosti alergijske stimulacije. Ponavljajoča izpostavitve alergenom vzdržuje nastajanje IgE protiteles. Izogibanje alergenom (npr. stroga dieta) pa vodi do počasnega upada nastajanja IgE (5).

Najpogostejši prehranski alergiji v otroštvu sta alergiji na mleko in jajca, ki se običajno prerasteta do šestega leta starosti. Alergiji na arašide in oreščke sta običajno dolgotraj-

ni in pogosto prisotni hkrati (koeksistenca). Večina pacientov je alergičnih na več kot en orešček (18).

V nadaljevanju je predstavljenih nekaj kliničnih primerov alergij pri otrocih, ki so bili obravnavani v Pediatrični ambulanti Splošne bolnišnice Novo mesto. Serumske vzorce smo analizirali na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko na analizatorju Immulite (Siemens). Rezultati so izpisani iz laboratorijskega informacijskega sistema in prikazani v spodnjih tabelah. Referenčne vrednosti za nulti razred za vse SPE so od 0 do 0,34 k/EL.

### Alergija na kravje mleko

V bolnišnico je bil septembra 2020 sprejet enomesečni deček z generalizirano urtikarijo. V laboratoriju smo izmerili zvišano koncentracijo SPE proti kravjemu mleku. Deček je dobil prilagojeno adaptirano mleko. Ob kontroli čez pol leta je zdravnik svetoval nadaljevanje diete.

	21. 9. 2020	2. 6. 2021
S-IgE celok. (kE/L) (<29)	7,12	
F2 mleko	0,990 II	0,202 0

### Alergija na jajca

Ob kontrolnem pregledu marca 2021 je bil štiriletni deček na strogi dieti brez jajc in jajčnih izdelkov zaradi anafilaktične reakcije po zaužitju jajc leta 2018. Kožni testi so bili negativni, z laboratorijskimi testi pa smo alergijo na jajca še dokazali. Zdravnik je odredil nadaljevanje stroge diete.

	5. 2. 2018	20. 12. 2018	3. 6. 2019	22. 3. 2021
IgE celok. (kE/L) (<29)		25,4	7,98	45,1
F1 jajčni beljak	21,7 IV	7,45 III	11,6 III	2,33 II
F75 jajčni rumenjak	3,29 II	0,967 II	4,27 III	0,668 I

## Alergija na arašide

Devetletni deček z alergijo na arašide je imel pri šestih me-

secih hujšo lokalno reakcijo. V laboratorijskih izvidih koncentracija SPE proti arašidom narašča. Potrebno je nadaljevanje stroge diete.

	19. 3. 2012	12. 12. 2016	6. 11. 2019
F13 arašidi	6,56 III	23,4 IV	62,9 V

Pol ure po zaužitju smokija se je 22-mesečni deklici okrog ust pojavil izpuščaj, oteklo ji je oko. V laboratoriju smo dokazali zvišane SPE za arašide. Zvišana je bila komponentna

ta rAra h 2 (določeno v drugem laboratoriju), ki predstavlja tveganje za hujšo reakcijo. Zdravnik je odredil strogo dieto brez arašidov.

	23. 5. 2019
IgE celok. (kE/L) (<29)	26,4
F13 arašidi	13,8 III

## Alergija na pršice, trave, arašide, lešnik

Ob kontrolnem pregledu junija 2021 je bil devetletni deček na dieti brez arašidov in lešnikov. Kožni testi: pršica - urtika 10 mm, eritem 30 mm; trave - urtika 6 mm, eritem 31 mm; arašidi - urtika 11 mm, eritem 32 mm; pozitivna kontrola - urtika 6 mm, eritem 25 mm. S kožnimi in laboratorijskimi testi smo še dokazali alergijo na pršice, cvetni prah trav, arašide in lešnike. Zdravnik je odredil strogo dieto brez arašidov in lešnikov ter izvajanje ukrepov za zmanjšanje koncentracije pršic v domačem okolju.

itivna kontrola - urtika 6 mm, eritem 25 mm. S kožnimi in laboratorijskimi testi smo še dokazali alergijo na pršice, cvetni prah trav, arašide in lešnike. Zdravnik je odredil strogo dieto brez arašidov in lešnikov ter izvajanje ukrepov za zmanjšanje koncentracije pršic v domačem okolju.

	28. 9. 2017	24. 11. 2017	18. 7. 2018	21. 10. 2019	30. 6. 2021
IgE celok. (kE/L) (<29)	434	356	376	537	670
F13 arašidi		17,8 IV			13,3 III
F17 lešnik		2,94 II		3,27 II	2,18 II
D1 Derma. pteronyssinus	24,1 IV				53,7 V
D2 Derma. farinae	24,1 IV				80,4 V

»



	28. 9. 2017	24. 11. 2017	18. 7. 2018	21. 10. 2019	30. 6. 2021
Panel orehi	18,9 IV				7,57 III
Panel trave I			27,4 IV		68,3 V

### Sekundarna prehranska alergija zaradi navzkrižnih reakcij na pelod breze

Ob kontrolnem pregledu maja 2021 je imel desetletni deček na obrazu kožne izpuščaje, bil je na dieti brez lešnikov, orehov, pomaranč, jabolk. Alergijski rinokonjunktivitis je

imel v spomladanskih mesecih. Kožni vbodni testi: leska, jelša in breza – urtika 10 mm; jabolko, pomaranča, lešnik – negativno; pozitivna kontrola – urtika 6 mm. Z laboratorijskimi testi smo dokazali tudi zvišane SPE za jabolko in pomarančo, ki so verjetno posledica navzkrižnih reakcij. Zdravnik svetuje dieto brez orehov in lešnikov, dieto brez jabolk pa le v času cvetenja leske, breze.

	3. 7. 2013	6. 12. 2013	18. 5. 2020	24. 5. 2021
IgE celok. (kE/L) (<29)	21,0	101	209	288
F17 lešnik			3,46 II	
F33 pomaranča	<0,100	<0,100		1,38 II
F49 jabolko		<0,100	1,57 II	8,46 III
T2 jelša				74,2 V
T3 breza				>100 VI
T4 leska				33,2 IV
Panel orehi	<0,100	<0,100	1,08 II	

### Colicae abdominales

Dvanajstletni deček je prišel na pregled zaradi bolečin v trebuhu nad popkom. Hemogram je bil brez posebnosti.

Deček je dobil tableto antihelminatika, saj je bila zaradi močno povišanih TIE zelo verjetna črevesna parazitoza.

	16. 12. 2019
IgE celok. (kE/L) (<87)	3436

## ZAKLJUČEK



Trenutno diagnostika alergij poteka od vrha navzdol (angl. *top-down*). Na podlagi anamneze zdravnik izbere alergene za testiranje, redko se za pridobitev natančnega IgE profila diagnostika nadaljuje z analizo alergenih komponent. Nedavno so predstavili pristop *bottom-up*, pri katerem se najprej določi profil senzibilizacije bolnika s pomočjo mikromrež in alergenih komponent, nato sledijo nadaljnje od-

ločitve (9). Določitev specifičnih IgE protiteles proti alergenim komponentam omogoča razlikovanje med pravimi in navzkrižno reaktivnimi alergeni, med trajno in prehodno alergijo, predvidi resnost simptomov, omogoča odkrivanje primarnega alergena za imunoterapijo (14). Razumevanje imunoloških mehanizmov alergijskih reakcij bo omogočilo zdravljenje ter izboljšalo diagnostiko alergij.

## LITERATURA

- Gupta N, Agarwal P, Sachdev A, Gupta D. Allergy Testing - An Overview. *Indian Pediatr.* 2019 Nov 15;56(11):951-957.
- Dona DW, Suphioglu C. Egg Allergy: Diagnosis and Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 16;21(14):5010.
- Barni S, Liccioli G, Sarti L, Giovannini M, Novembre E, Mori F. Immunoglobulin E (IgE)-Mediated Food Allergy in Children: Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Prevention, and Management. *Medicina (Kaunas).* 2020 Mar 4;56(3):111.
- Michelet M, Balbino B, Guilleminault L, Reber LL. IgE in the pathophysiology and therapy of food allergy. *Eur J Immunol.* 2021 Mar;51(3):531-543.
- Eckl-Dorna J, Villazala-Merino S, Campion NJ, et al. Tracing IgE-Producing Cells in Allergic Patients. *Cells.* 2019 Aug 28;8(9):994.
- Peters RL, Krawiec M, Koplin JJ, Santos AF. Update on food allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2021; 32: 647–657.
- De Martinis M, Sirufo MM, Suppa M, Ginaldi L. New Perspectives in Food Allergy. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 21;21(4):1474.
- Du Toit G, Sampson HA, Plaut M, Burks AW, Akdis CA, Lack G. Food allergy: Update on prevention and tolerance. *J Allergy Clin Immunol.* 2018 Jan;141(1):30-40.
- Ansotegui IJ, Melioli G, Canonica GW, et al. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organ J.* 2020 Feb 25;13(2):100080.
- Hayes MD, Ward S, Crawford G, et al. Inflammation-induced IgE promotes epithelial hyperplasia and tumour growth. *Elife.* 2020 Jan 14;9:e51862.
- Atkins D, Leung DYM. Diagnosis of Allergic Disease. In: Kliegman RM, editor. *Nelson Textbook of pediatrics.* 19th ed. Elsevier; 2011. p. 764 – 768.
- Dodig S. Current Laboratory Diagnosis of Allergy. *Rad. Medical Sciences.* Zagreb 2008, str. 117 – 128.
- Kowal K, DuBuske L. Overview of in vitro allergy tests. Dostopno na: <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-in-vitro-allergy-tests>
- Dodig S, Čepelak I. The potential of component-resolved diagnosis in laboratory diagnostics of allergy. *Biochem Med (Zagreb).* 2018 Jun 15;28(2):020501.
- Werfel T, Asero R, Ballmer-Weber BK, et al. Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. *Allergy.* 2015 Sep;70(9):1079-90.
- Popescu FD, Vieru M. Precision medicine allergy immunoassay methods for assessing immunoglobulin E sensitization to aeroallergen molecules. *World J Methodol.* 2018 Nov 29;8(3):17-36.
- Satitsuksanoa P, Daanje M, Akdis M, Boyd SD, van de Veen W. Biology and dynamics of B cells in the context of IgE-mediated food allergy. *Allergy.* 2021 Jun;76(6):1707-1717.
- Berlin MC. Mechanisms that define transient versus persistent food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 Feb;143(2):453-457.

# Koronavirusna bolezen (covid-19) pri otrocih

**Tatjana Pavlin**

Splošna bolnišnica Novo mesto, Oddelek za pediatrijo

## UVOD

Koronavirusi pri otrocih praviloma povzročajo blage okužbe dihal v zimskih mesecih. Novi koronavirus SARS-CoV-2 povzroča koronavirusno bolezen covid-19 (covid-19), lahko pa povzroči tudi zelo nevaren večorganski vnetni sindrom (angl. *Multisystem Inflammatory Syndrome MIS-C*). Glavna načina prenosa sta kapljični in kontaktni. Povprečna inkubacijska doba je štiri do šest dni.

Večina otrok bolezen preboli v enem do dveh tednih. Otroci obolevajo s podobnimi simptomi kot odrasli, z nekaj

posebnostmi. Večina ima blag potek, zapleti pa so lahko zelo resni. Ponovne okužbe so redke in praviloma blage. Velik delež (najmanj 40 %) hospitaliziranih otrok je odkritih zaradi rutinskega testiranja (1).

Covid-19 je večinoma samoozdravljiv v enem do dveh tednih. Pri otrocih simptomi redko trajajo dlje kot štiri tedne (slabo počutje, glavobol, motnje spanja, bolečine v sklepih in mišicah, težave z dihalo, palpitanje, motnje voha in okusa).

## KLINIČNA SLIKA

Večina otrok, ki zbolijo zaradi covid-19, ima nekatere od naslednjih simptomov:

- vročina,
- kašelj,
- težko dihanje,
- bolečine v mišicah,
- izcedek iz nosu,
- vneto žrelo,
- glavobol,
- slabost/bruhanje,
- bolečine v trebuhu,
- driska,
- izguba okusa in voha (ali odklanjanje goste hrane).

Mlajši otroci imajo pogosteje povišano temperaturo kot starejši, starejši otroci pa imajo večkrat glavobol in bolečine v mišicah ter izgubo voha in okusa. Pri mlajših otrocih je nekatere simptome težje ugotovljati.

K sreči redki pa so naslednji simptomi:

- prizadetost srca,
- prizadetost centralnega živčevja,
- MIS-C.

»

## LABORATORIJSKE PREISKAVE

Zelo velik je pomen laboratorijskih preiskav, ki lahko napovejo hujši potek bolezni, zelo pomembne pa so tudi za spremljanje poteka okužbe in pravočasno ugotavljanje možnih zapletov.

Bolezni in stanja, ki omogočajo hujši potek covid-19:

- genetsko ozadje (npr. Downov sindrom),

- nekatera nevrološka obolenja,
- presnovne motnje (npr. sladkorna bolezen),
- prirojene srčne napake oz. kardiovaskularna obolenja,
- debelost,
- astma in druga kronična pljučna obolenja,
- imunosupresivna stanja (1).

## MIS-C PRI OTROCIH

MIS-C je pri otrocih znan tudi kot večorganski vnetni sindrom pri otrocih (angl. *Paediatric multisystem inflammatory syndrome, PIMS*). Incidenca tega resnega zapleta je manj kot 1 % potrjenih okužb. Pride do nenormalnega imunskega odziva na virus, do aktivacije makrofagov in sproščanja citokinov. MIS-C ima nekaj skupnih značilnosti s Kawasakijevim sindromom pri otrocih, vendar je le-ta pogostejši pri mlajših otrocih, MIS-C pa pri nekoliko starejših (3). Diagnozo postavimo na podlagi klinične slike in laboratorijskih izvidov. Pri vseh otrocih z MIS-C je pozitivna serologija na SARS-CoV-2. Zaplet se pojavi dva do šest tednov po okužbi, ki je lahko bila tudi asimptomatska (2).

MIS-C – klinična slika:

- povišana telesna temperatura (100 %),
- gastrointestinalni simptomi (60 do 100 %),
- izpuščaji (45 do 76 %),
- konjunktivitis (30 do 81 %),
- vnetje ustne sluznice (21 do 65 %),
- vnetje žrela (10 do 16 %),
- bolečine v mišicah (8 do 17 %),
- otekline dlani/podplavov (9 do 16 %),
- povečane bezgavke (6 do 16 %),
- prizadetost srca (v 80 %) – miokarditis, motnje ritma, perikarditis, kardiogeni šok.

Laboratorijske preiskave so poleg klinične slike hudo bolnega otroka ključne pri diagnozi. Laboratorijske preiskave, ki ob odstopanjih rezultatov napovedujejo hujši potek bolezni, so: C-reaktivni protein (CRP), prokalcitonin (PCT), interleukin 6, feritin, D-dimer.

Laboratorijske preiskave, ki jih uporabljamo ob kliničnih znakih hujšega poteka covid-19:

- zvišan C-reaktivni protein (54 %),
- zvišan feritin (47 %),
- zvišan encim laktat dehidrogenaza – LDH (37 %),
- zvišan D-dimer (35 %),
- zvišan prokalcitonin (21 %),
- zvišana sedimentacija eritrocitov (19 %),
- zvišani levkociti (20 %),
- limfocitopenija (19 %),
- limfocitoza (8 %),
- zvišane aminotransferaze (30 %),
- zvišana kreatin kinaza (25 %),
- zvišan pro-BNP (nespecifično povišan pri okužbah).

Zvišani označevalci vnetja in limfocitopenija lahko nakazujejo MIS-C. »

## PREPREČEVANJE OKUŽBE

Kot za vse nalezljive bolezni tudi za covid-19 velja, da se je najbolje izogniti bližnjemu stiku z okuženo osebo. Upo-

štovati je treba varnostno razdaljo in uporabljati ustrezno zaščitno opremo. Zelo učinkovito je tudi cepljenje.

## COVID-19 PRI OTROCIH V SPLOŠNI BOLNIŠNICI NOVO MESTO

Prvi primer otroka covidom-19 na Oddelku za pediatrijo v Splošni bolnišnici Novo mesto je bil pacient po poškodbi roke, pri katerem je bil predviden kirurški poseg. Starša sta nekaj tednov prej imela simptome covid-19, vendar glede na takrat veljavna pravila nista bila testirana. Oče je pred tem pripotoval iz Španije. Otrok je imel blage znake okužbe, ob testiranju pred predvidenim operativnim posegom pa je bil že asimptomatski.

Večina otrok z dokazanim covidom-19 je bila v Splošni bolnišnici Novo mesto obravnavanih ambulantno zaradi blagih respiratornih simptomov, vročine in/ali prebavnih težav. Hospitalizirali smo 18 otrok v letu 2020, 37 v letu 2021, samo januarja 2022 že 9. V Ljubljano smo zaradi covid-19 premestili 5 otrok, od tega tri zaradi suma na MIS-C, ki je bil potrjen.

### Primer I

Deček, star 22 mesecev, je zbolel z vročino do 39 °C in bolečinami v ušesih. Dobil je antibiotik in po enem tednu se je pojavila urtikarija. Vročina je vztrajala in tretji dan hospitalizacije je prišlo do dviga vnetnih kazalcev, pro-BNP-ja (1132 ng/L) in D-dimera (8,52 mg/L).

## ZANIMIVOST

Dojenje pomembno vpliva na blažji potek bolezni, zato se seveda svetuje tudi, če je mati okužena (4). Večina novorojenčkov, rojenih v porodnišnici v Novem mestu okuženim mamam, se ni okužilo, vsi pa so bili asimptomatski (tudi tisti s potrjeno okužbo).

Družinska in osebna anamneza sta bili brez posebnosti. Iz epidemiološke anamneze pa smo izvedeli, da je bila okužena njegova vzgojiteljica.

Premeščen je bil na Kliniko za infekcijske bolezni in vročinska stanja v Ljubljani. Ob simptomatskem zdravljenju je prišlo do popolnega kliničnega in laboratorijskega izboljšanja.

### Primer II

Deklica, stara 8,5 let, je zbolela z vročino do 40 °C, z mrzlico, izpuščajem, bolečinami v trebuhu. Vnetni kazalci so bili visoki, brez očitnega žarišča vnetja (SR 55, CRP 140,7 mg/L, troponin 16 ng/L, pro BNP 2304 ng/l, AST 2,38, ALT 2,56  $\mu$ kat/L, gama GT 1,01  $\mu$ kat/L).

Družinska in osebna anamneza sta bili brez posebnosti. Deklica je prebolela covid-19 marca 2021.

Premeščena je bila na Kliniko za infekcijske bolezni in vročinska stanja v Ljubljani, kjer so ugotovili prizadetost srčne mišice in uvedli dolgotrajno zdravljenje z aspirinom 100. »

## ZAKLJUČEK

Bolezen covid-19 pri otrocih v veliki večini primerov poteka asimptomatsko ali v blagi obliki. Možen pa je tudi resen zaplet – večorganski vnetni sindrom. V obravnavi otroka s covidom-19 so laboratorijske preiskave poleg kliničnega spremljanja ključne.

Epidemija covida-19 je še vedno razmeroma nova, sevi virusa se spreminjajo in v povezavi s to boleznijo je vsakodnevno objavljenih vedno več novih dognanj.

## LITERATURA

1. UpToDate. COVID-19: Clinical manifestations and diagnosis in children. Dosegljivo na: <https://www.uptodate.com>.
2. Plankar Srovin T, Avramoska T, Bahovec N, Bizjak Vojinovič S, Granda A, Lah L et al. Koronavirusna bolezen (covid-19) pri otrocih. Slovenska pediatrija. 2020; 27(3):107-17.
3. Pšeničny E, Pristov N. Razlikovanje med Kawasakijsko boleznijo in večorganskim vnetnim sindromom pri otrocih v povezavi s SARS-CoV-2 okužbo. Medicinski razgledi. 2021; 60(4):473-83.
4. World Health Organisation. Coronavirus disease (covid-19) Pandemic. Dosegljivo na: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.

# Farmakogenomika: pot do bolniku prilagojenega zdravljenja

**Nataša Karas Kuželički**

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo

## UVOD

Osnovna načela farmakogenetike je že leta 1909 postavil britanski zdravnik sir Archibald E. Garrod v svojem revolucionarnem delu *The inborn errors of metabolism*, v katerem ugotavlja, da je vsako zdravilo lahko strup v dovolj visokem odmerku, ter da se posamezniki lahko zelo različno odzovejo na enak odmerek zdravilne učinkovine. Garrodove ugotovitve zelo dobro povzemajo opredelitev farmakogenetike, ki se je kot samostojna veda začela razvijati šele v osemdesetih letih 20. stoletja, kar sovpada z razvojem genotipizacijskih metod, kot sta Sangerjevo sekvenciranje in pomnožitvena reakcija s polimerazo (PCR). Pravi zagon ter potencial za dejansko implementacijo v klinično prakso pa je farmakogenetika dobila z dokončanjem projekta Človeški genom v začetku 21. stoletja. Temelje farmakogenetike kot samostojne vede je leta 1957 uvedel profesor genetike na Univerzi v Washingtonu Arno Motulsky, ki velja za "očeta farmakogenetike", izraz farmakogenetika pa je leta 1959 skoval nemški genetik Friedrich Vogel z Univerze v Heidelbergu (1).

V začetku 21. stoletja se je poleg izraza farmakogenetika, ki se ukvarja s spremembami genov za encime, ki presnavljajo zdravilne učinkovine, pojavil tudi izraz farmakogenomika, ki naj bi obsegal tudi druge farmakogenetske označevalce, kot so prenašalci in tarčne molekule zdravilnih učinkovin. Glavni namen farmakogenetike/genomike je torej prilagoditi zdravljenje z zdravili posameznemu bolniku z namenom optimizacije varnosti in učinkovitosti. Kasneje se je načelo individualizacije iz farmakoterapije razširilo tudi na druge terapevtske posege, kar zajema izraz personalizirana medicina, v zadnjih nekaj letih pa smo poleg genomskih pristopov za individualizacijo zdravljenja začeli uporabljati druge -omike (metabolomika, proteomika, transkriptomika in epigenetika), kar pa zajema pojem precizna medicina.

## RAZVOJ FARMAKOGENETIKE IN KLINIČNE SMERNICE

Prvi primeri uporabe farmakogenetike v praksi segajo v čas druge svetovne vojne, ko so ZDA svoje vojake pošiljale na bojišča po vsem svetu, tudi na področja z endemično malarijo. Pri preventivni aplikaciji antimalarikov vojakom so pri približno 10 % Afroameričanov opazili hud stranski učinek zdravila, ki se je kazal kot obsežna znotrajžilna hemoliza. Kasneje so ugotovili, da imajo omenjeni vojniki pomanjkanje glukoza-6-fosfat dehidrogenaze zaradi mutacij v G6PD genu (1). Gre za najpogostejšo presnovno motnjo pri človeku, ki so jo opazili že v antiki zaradi ne-

zmožnosti uživanja nekaterih stročnic (favizem), za katero trpi 400 milijonov ljudi. Pomanjkanje encima povzroča manjšo produkcijo NADPH, ki je nujno potreben za regeneracijo glutationa. Ker imajo osebe s pomanjkanjem G6PD nižje koncentracije glutationa v eritrocitih, so le-ti bolj občutljivi na oksidante, ki jih zaužijemo, bodisi v obliki hrane ali zdravil. Okvara je najbolj pogosta v področjih z malarijo, saj imajo heterozigoti delno odpornost proti malariji, zato se pogostost polimorfizmov G6PD zelo razlikuje med populacijami. Povezava med G6PD in an- »



timalariki je pomembna tudi danes, saj je pogostost okvare največja ravno v populacijah, pri katerih se antimalariki najbolj uporabljajo.

V sedemdesetih in osemdesetih letih 20. stoletja je večina raziskav obsegala gene, ki kodirajo za citokrome, predvsem CYP2D6, 2C19 in 2C9. Omenjeni geni še danes obsegajo največji delež farmakogenetskih preiskav, saj so odgovorni za presnovo večine zdravil. Kasneje so poleg CYP začeli preiskovati tudi druge zdravila presnavljajoče encime, kot so tiopurin-S-metil transferaza (TPMT), ki deaktivira tiopurinska zdravila, UDP-glukuronil transferaza (UGT1A1) in dihidropirimidin dehidrogenaza (DPYD), ki sodelujeta pri presnovi citostatikov irinotekana in 5-fluoro uracila (1).

V 21. stoletju se fokus z encimov premika na prenašalce zdravil (statini in metotreksat v povezavi s SLC01B1) in tarčne molekule. Na primer zdravilo proti raku gefitinib (Iressa®) je učinkovito le pri bolnikih z mutacijo v genu EGFR (oz. HER1), ki kodira receptor za epidermalni rastni faktor, katerega zaviralec je gefitinib.

Kljub številnim odkritim pomembnim povezavam gen-zdravilo, pa je bila glavna ovira pri implementaciji omenjenih spoznanj v klinično prakso pomanjkanje standardizacije in konkretnih smernic za uporabo farmakogenetskih označevalcev pri prilagoditvi zdravljenja v skupini bolnikov s specifično diagnozo. S tem namenom sta bili ustanovlje-

ni Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG), katere priporočila so implementirana predvsem na območju EU, in Clinical Pharmacogenetic Implementation Consortium (CPIC), ki deluje predvsem v ZDA. Od leta 2005 je DPWG sistematično pregledala 97 potencialnih interakcij gen-zdravilo, od tega jih je 54 opredelila kot potencialno klinično pomembne. Vzporedno je CPIC izdala priporočila za več kot 40 zdravil (2). Priporočila DPWG in CPIC so si zelo podobna, niso pa identična – trenutno potekajo napori za harmonizacijo le-teh (3).

Najbolj obsežna baza podatkov s področja farmakogenomike, ki združuje priporočila DPWG, CPIC in Food and drug administration (FDA) je Pharmacogenomics knowledge base (PharmGKB) (4). PharmGKB je bila ustanovljena leta 2000 na Univerzi Stanford in jo financira National Institute of Health (NIH). Najpomembnejša informacija za klinike, ki jo ponuja PharmGKB, so klinične anotacije. Le-te dajo informacijo o tem, kako močna je povezava med genom (polimorfizmom) in določenim zdravilom. Klinične anotacije imajo šest stopenj: 1A, 1B, 2A, 2B, C in D. Pari gen-zdravilo z anotacijo 1A imajo zelo dobro dokazano povezavo oziroma vpliv določene polimorfizma na odziv na specifično zdravilo in imajo skoraj vedno CPIC smernice za klinično implementacijo, pri tistih z anotacijo D pa povezava ni bila dokazana ali pa je bila dokazana na majhnem številu bolnikov oziroma na *in vitro* modelih.

## IMPLEMENTACIJA FARMAKOGENOMIKE V KLINIČNO PRAKSO

### Vpeljava farmakogenomike v primarno zdravstveno oskrbo

Prvi uspešni primeri vpeljave farmakogenomike v klinično prakso so se zgodili v primerih zdravil z ozkim terapevtskim intervalom, kot so na primer citostatiki. Gre za zdravljenje bolezni, ki ogrožajo življenje (rak) in zahtevajo specialistično obravnavo. Ravno zato so vsaj desetletje po zelo uspešni vpeljavi farmakogenetskega testiranja bolnikov na tiopurinski terapiji z akutno limfoblastno levkemijo, vnetnimi črevesnimi boleznimi, avtoimunskimi boleznimi in po transplataciji organov, farmakogenetske preiskave obdržale butično naravo in so bile rezervirane za majhno skupino bolnikov.

Šele v zadnjem desetletju uporaba farmakogenetskih pristopov prodira tudi v primarno zdravstveno oskrbo in se uporablja pri predpisovanju pogosto uporabljenih zdravil v splošni populaciji. Poudariti je treba, da se farmakogenetski pristopi pri obravnavi življenje ogrožajočih bolezni zdaj uporabljajo v večini dobro in srednje razvitih držav, medtem ko je uporaba farmakogenetike na primarni ravni omejena samo na določene države, kjer prednjačita Nizozemska in ZDA. Kot kažejo izkušnje iz teh držav, so za uspešno implementacijo farmakogenetike na primarno raven zdravstva nujno potrebni ustrezna infrastruktura (predvsem v smislu računalniške mreže elektronske baze podatkov), multidisciplinarni timi strokovnjakov (zdravnik, »

farmacevt, laboratorijski delavec, klinični genetik), ustrezne klinične smernice (npr. CPIC), ustrezna izobraženost strokovnjakov in bolnikov ter multidisciplinarno vodenje in nadzor takih programov (5).

### Projekt "PGx Passport"

Nizozemska je danes verjetno najuspešnejša država na področju implementacije farmakogenetike na primarni zdravstveni ravni, saj gre za iniciativo na državni ravni pod imenom Projekt PGx Passport (3). Obstajata dva pristopa pri farmakogenetskem testiranju v diagnostične namene:

- Predterapevtsko testiranje enega gena (ali manjšega števila genov) izvedemo samo pri bolnikih, ki jim je predpisano ali že jemljejo določeno zdravilo. Informacijo farmakogenetskega testiranja uporabimo takoj.
- Preemptivno testiranje večjega števila (panela) genov izvedemo pri zdravih posameznikih, ki nimajo predpisanega zdravila. Informacijo farmakogenetskega testiranja uporabimo v prihodnosti, če se pri posamezniku pokaže potreba po jemanju določenega zdravila.

Projekt PGx Passport uporablja drugi pristop in v ta namen je DPWG sestavila seznam genov in polimorfizmov z velikim kliničnim vplivom na odziv na pogosto predpisovana zdravila. Vključitvena merila za polimorfizme so: obstoječe DPWG smernice, dokazan funkcijski vpliv polimorfizma na protein, frekvenca redkejšega alela (MAF) v splošni populaciji je večja ali enaka 1 %. V PGx Passport panel so vključeni tudi nekateri polimorfizmi z MAF < 1 % pod pogojem, da je njihova MAF v specifični subpopulaciji (Afričani, Azijci, Kavkazijci) > 1 %, ali če obstajajo zelo močni dokazi za povezavo med polimorfizmom in odzivom na zdravilo. V končni panel je tako vključenih 58 variantnih alelov v 14 genih, ki vplivajo na odziv na 49 pogosto predpisovanih zdravil (Preglednica 1). Od 49 zdravil jih je največ iz skupine antidepresivov (n = 10), sledijo imunosupresivi in citostatiki (n = 5), zdravila za zdravljenje okužb, antikoagulanti, antiepileptiki, antipsihotiki (n = 4), zaviralci protonske črpalke (n = 3), antiaritmiki, analgetiki, zdravila za zniževanje lipidov (n = 2), antihipertenzivi, psihostimulansi, zdravila za Gaucherjevo bolezen in kontraceptivi (n = 1). Avtorji ocenjujejo, da bo 50 % Nizozemcev, starejših od 65 let, v naslednjih štirih letih potrebovalo vsaj eno zdravilo iz panela, 25 % pa jih bo potrebovalo dve ali več, kar kaže na veliko praktično uporabnost in ekonomsko upravičenost omenjenega pristopa. Treba pa se je zavedati, da je panel dinamičen, in da se bo zaradi novih študij in znanstvenih spoznanj število vključenih polimorfizmov, genov in zdravil s časom povečevalo (3).

## FARMAKOGENETSKI TESTI – TESTIRANJE PREKO SPLETA

Diagnostični testi so bili v preteklosti zgolj v domeni medicine, se pravi zdravnikov in laboratorijskih delavcev, v zadnjem desetletju pa sta se zelo razširila t. i. samotestiranje ter testiranje preko spleta („direct-to-consumer testing“), pri katerih je interpretacija rezultatov testa (v primeru samotestiranja pa tudi njegova izvedba) bolj kot ne prepuščena laičnemu uporabniku. Prednost tovrstnega testiranja je hiter in enostaven dostop do informacij o lastnem zdravstvenem stanju. Po drugi strani pa za uporabnika nosi tudi potencialne nevarnosti, kot so sprejemanje odločitev o zdravljenju in preprečevanju bolezni na osnovi napačne ali nepopolne interpretacije rezultatov diagnostičnih testov.

### Primer spletnega ponudnika farmakogenetskega testiranja (23andMe)

Podjetje 23andMe je na tržišču najdlje prisoten ponudnik farmakogenetskega testiranja preko spleta in ponuja tudi najširšo paleto farmakogenetskih testov, čeprav se je njihova ponudba po letu 2013 zmanjšala zaradi kritik s strani FDA (6). Glavna kritika farmakogenetskega testiranja preko spleta s strani stroke temelji na odsotnosti svetovanja in razlage rezultatov testiranja s strani strokovnjakov, poleg tega se merila za vključitev polimorfizmov in genov v testni panel pri spletnih ponudnikih razlikujejo od vključenih meril DPWG, CPIC in FDA. 23andMe na primer pojmuje polimorfizme za klinično pomembne, če vsaj trije znanstveni »

članki potrdijo povezavo med polimorfizmom in odzivom na zdravilo. To lahko privede do opredelitve polimorfizmov, ki jih DPWG, CPIC in FDA ne obravnavajo kot klinično pomembne, kot odločilne za odziv na zdravilo, kar lahko vodi v napačne odločitve bolnika glede zdravljenja in nepotrebno zaskrbljenost (6). Po drugi strani pa spletni ponudniki testiranj pogosto ne vključujejo v svoje testne panele polimorfizmov, ki so po DPWG, CPIC in FDA opredeljeni kot klinično pomembni, kar ravno tako vodi do zavajajočih rezultatov. Pogosto spletni ponudniki ne upoštevajo etnične pripadnosti preiskovanca kot tudi dejstva, da se lahko pogostost in s tem pomembnost nekega polimorfizma razlikuje med različnimi populacijami, kar nadalje otežuje interpretacijo rezultatov (6). Zaradi vsega tega je bilo podjetje 23andMe po strogi kritiki FDA prisiljeno omejiti obseg ponujenih farmakogenetskih testov. Oktobra 2018 je FDA podjetju 23andMe dala odobritev za izvajanje farmakogenetskih testov, ki obsegajo 33 polimorfizmov v osmih genih (označeni z # v Preglednici 1). Kljub odobritvi pa FDA opozarja, da se na osnovi rezultatov omenjenih testov ne sme spreminjati zdravljenja, in da morajo biti rezultati spletnega testiranja potrjeni v kliničnem laboratoriju, preden jih uporabimo kot podlago za spreminjanje ali uvajanje zdravljenja (7).

## Svetovanje pri farmakogenetskem testiranju preko spleta

Pri svetovanju in interpretaciji rezultatov farmakogenetskega testiranja preko spleta je treba upoštevati naslednje smernice in dejstva:

- Rezultati spletnega farmakogenetskega testiranja niso podlaga za spreminjanje obstoječega zdravljenja. Omenjeni rezultati morajo biti potrjeni s strani medicinskega laboratorija, preden so uporabljeni kot podlaga za odločitve o spremembi/uvredbi zdravljenja.
- Pomembne smernice za klinično uporabo farmakogenetskih označevalcev so dostopne na spletni strani CPIC (2).
- Genotip divjega tipa ne zagotavlja, da bo imel bolnik normalno presnovo določenega zdravila, saj večina farmakogenetskih testov ne vključuje zelo redkih in še neodkritih mutacij.
- Različne mutacije v določenem farmakogenu niso enako klinično pomembne. Nekatere vplivajo na odziv na zdravilo, druge pa ne, kar je opredeljeno v CPIC smernicah.

- Če bolnik dobro prenaša že obstoječe zdravilo, ni nujno, da zdravljenje spreminjamo zaradi rezultatov farmakogenetskega testiranja.
- Poleg genetskih dejavnikov na bolnikov odziv na zdravilo vplivajo tudi interakcije med zdravili, hrana, mikrobiom in drugi dejavniki okolja.
- Rezultati farmakogenetskih testov niso čarobna rešitev, nam pa lahko pomagajo pri izbiri ustreznega zdravila in odmerka, kar poveča verjetnost uspešnega izida zdravljenja že v prvem poskusu.
- Rezultati farmakogenetskega testiranja imajo doživljenjsko uporabnost za bolnika in bi morali biti zabeleženi v njegovem zdravstvenem kartonu in/ali kartici, pri čemer bi morali biti visoko tvegani genotipi posebej označeni.

## Posledice spletnega farmakogenetskega testiranja za bolnika

Glavna skrb strokovne javnosti glede farmakogenetskega testiranja preko spleta je bila sprejemanje napačnih odločitev glede zdravljenja s strani uporabnikov (bolnikov) brez posveta z zdravstvenimi delavci. Študija iz leta 2017 je pokazala, da je med 961 uporabniki spletnega farmakogenetskega testiranja kar 91% prejelo informacijo o odstopanju genotipa od divjega tipa (na vsaj enem testiranem lokusu). Kljub temu jih je na osnovi teh informacij samo 5,6 % spremenilo zdravljenje, bodisi v smislu prehoda na drugo zdravilo ali spremembe odmerka. Od teh, ki so spremenili zdravljenje na osnovi rezultatov spletnega testiranja, se jih je kar 83 % prej posvetovalo z zdravnikom. Sklepamo lahko torej, da je manj kot 1 % uporabnikov spletnega farmakogenetskega testiranja pridobljene rezultate uporabilo za spremembo zdravljenja brez odobritve zdravnika (8).

Študija iz leta 2018 je primerjala izkušnjo farmakogenetskega testiranja med uporabniki tovrstnega testiranja v kliničnem laboratoriju in preko spleta. Večina uporabnikov iz obeh podskupin (87,5 %) je izkušnjo testiranja opisala kot pozitivno in koristno. Štirideset odstotkov uporabnikov v obeh skupinah je bilo zaskrbljenih zaradi zasebnosti in varovanja podatkov. Razlike med skupinama pa so se pokazale v samopercepciji razumevanja rezultatov testiranja, in sicer je več kot 77 % uporabnikov kliničnih laboratorijev izjavilo, da so popolnoma razumeli rezultate testiranja, enako pa samo 51,5 % uporabnikov testiranja na daljavo (9). »

## SKLEP

Pričakujemo lahko, da bo v prihodnjem desetletju farmakogenetsko testiranje postalo običajna praksa na primarnem nivoju zdravstva, kar bo omogočalo večjo učinkovitost in varnost zdravil. Veliko vlogo pri postavitvi in

vzdrževanju tega sistema bodo imeli multidisciplinarni timi zdravnikov, farmacevtov, laboratorijskih delavcev in kliničnih genetikov.

**Preglednica 1: Polimorfizmi, geni in zdravila vključeni v PGx Passport panel (3).** CYP, citokrom P450; DPYD, dihidropirimidin dehidrogenaza; F5, faktor V Leiden; HLA, humani levkocitni antigen; NUDT, nudiks hidrolaza; SLCO, prenašalec organskih anionov; UGT, UDP-glukuronil transferaza; TPMT, tiopurin S-metil transferaza; VKORC, vitamin K epoksid reduktazni kompleks; geni označeni z # so vključeni v panel farmakogenetskih preiskav, ki jih ponuja spletni ponudnik 23andMe.

**Table 1: Polymorphisms, genes and drugs included in the PGx Passport panel.** CYP, cytochrome P450; DPYD, dihydropyrimidine dehydrogenase; F5, factor V Leiden; HLA, human leucocyte antigen; NUDT, nudix hydrolase; SLCO, organic anion transporter; UGT, UDP-glucurosyl transferase; TPMT, thiopurine S-methyltransferase; VKORC, Vitamin K epoxide reductase complex; # genes included in phamacogenetic panel offered by direct-to-consumer genetic testing provider 23andMe.

Gen	Variantni aleli	Vpliv na protein	Zdravila
CYP2B6	*4,*5,*6,*9,*16,*18	Zmanjšana aktivnost	Efavirenz
CYP2C9 #	*2,*3,*5,*11	Zmanjšana aktivnost	Fenitoin Varfarin
CYP2C19 #	*2,*3,*4A/B,*5,*6,*8, *9,*10  *17	Zmanjšana aktivnost  Povečana aktivnost	Klopidogrel Citalopram Escitalopram Sertralin Imipramin Lansoprazol Omeprazol Pantoprazol Vorikonazol
CYP2D6 #	*xN  *3,*4,*5,*6,*8,*9,*10, *14A,*14B,*17,*41	Povečana aktivnost  Zmanjšana aktivnost	Amitriptilin Aripiprazol Atomoksetin Klomipramin Kodein Doksepin Eliglustat Flekainid Haloperidol Imipramin Metoprolol Nortriptilin Paroksetin Pimozid Propafenon Tamoksifen Tramadol Venlafaksin Zuklopentiksol

»

Gen	Variantni aleli	Vpliv na protein	Zdravila
CYP3A5 #	*3,*6,*7	Zmanjšana aktivnost	Takrolimus
DPYD #	*2A,*13, 2846A>T, 1236G>A	Zmanjšana aktivnost	5-Fluorouracil Kapecitabin Tegafur
F5	1691G>A	Zmanjšana aktivnost	Estrogenska hormonska kontracepcija
HLA-A	*31:01	Poveča tveganje za stranske učinke	Karbamazepin
HLA-B	*15:02  *15:11 *57:01 *58:01	Poveča tveganje za stranske učinke	Karbamazepin Okskarbazepin Fenitoin Lamotrigin  Karbamazepin  Abakavir Flukloksacilin  Alopurinol
NUDT15	*2,*3,*6,*9	Zmanjšana aktivnost	6-Merkaptopurin Azatioprin Tiogvanin
SLCO1B1 #	*5,*15,*17	Zmanjšana aktivnost	Atorvastatin Simvastatin
TPMT #	*2,*3A,*3B,*3C	Zmanjšana aktivnost	6-Merkaptopurin Azatioprin Tiogvanin
UGT1A1 #	*6,*27,*28,*37	Zmanjšana aktivnost	Irinotekan
VKORC1	-1639G>A, 1173 C>T	Zmanjšana aktivnost	Acenokumarol Fenprokumon Varfarin

&gt;&gt;

## LITERATURA

1. Pirmohamed M. Pharmacogenetics: past, present and future. *Drug Discov Today*. 2011;16(19-20):852-61.
2. CPIC. CPIC guidelines [Available from: <https://cpicpgx.org/guidelines/>].
3. van der Wouden CH, van Rhenen MH, Jama WOM, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM, Konta L, et al. Development of the PGx-Passport: A Panel of Actionable Germline Genetic Variants for Pre-Emptive Pharmacogenetic Testing. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;106(4):866-73.
4. (PharmGKB) PKB. [Available from: <https://www.pharmgkb.org/>].
5. Petry N, Baye J, Aifaoui A, Wilke RA, Lupu RA, Savageau J, et al. Implementation of wide-scale pharmacogenetic testing in primary care. *Pharmacogenomics*. 2019;20(12):903-13.
6. Lu M, Lewis CM, Traylor M. Pharmacogenetic testing through the direct-to-consumer genetic testing company 23andMe. *BMC Med Genomics*. 2017;10(1):47.
7. Gammal RS, Mayes J, Caudle KE. Ready or not, here it comes: Direct-to-consumer pharmacogenomic testing and its implications for community pharmacists. *J Am Pharm Assoc* (2003). 2019;59(5):646-50.
8. Carere DA, VanderWeele TJ, Vassy JL, van der Wouden CH, Roberts JS, Kraft P, et al. Prescription medication changes following direct-to-consumer personal genomic testing: findings from the Impact of Personal Genomics (PGen) Study. *Genet Med*. 2017;19(5):537-45.
9. Lemke AA, Hulick PJ, Wake DT, Wang C, Sereika AW, Yu KD, et al. Patient perspectives following pharmacogenomics results disclosure in an integrated health system. *Pharmacogenomics*. 2018;19(4):321-31.

# Bolnik kot partner v sodobni medicinski obravnavi

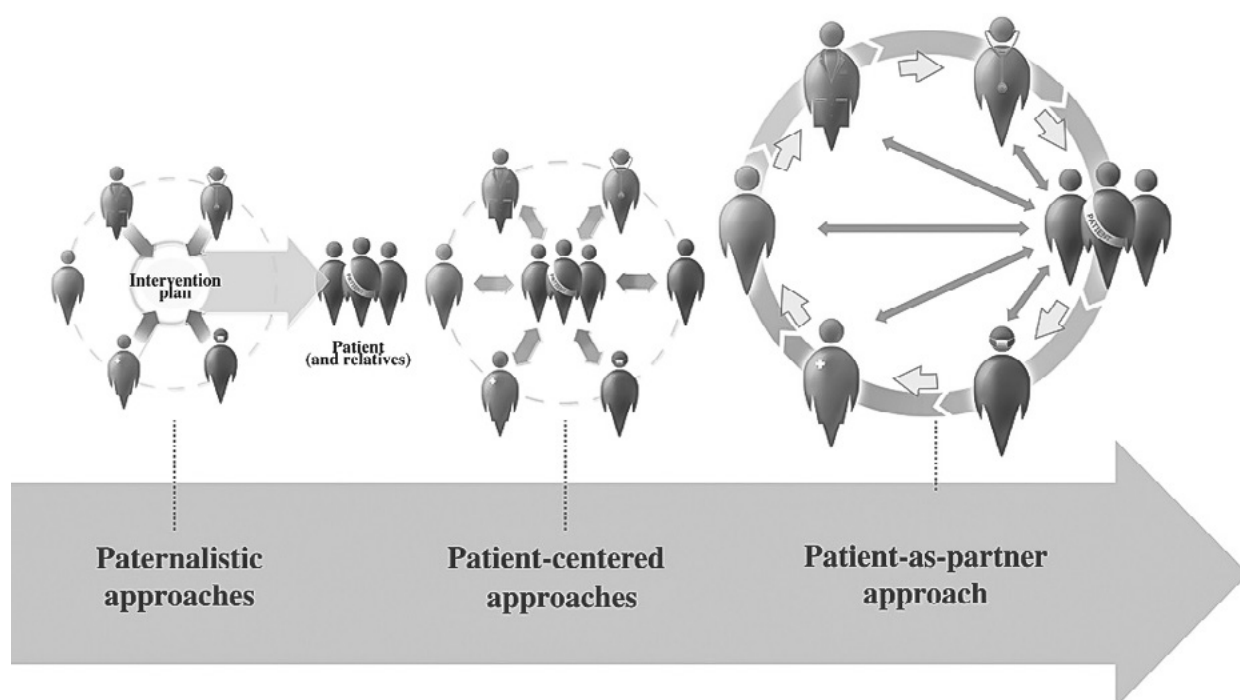
**Janja Marc**

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo  
Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

## RAZVOJ MODELOV MEDICINSKE SKRBI

Nov model zdravstvene skrbi se od tradicionalnega (paternističnega) razlikuje po tem, da je zdravstvena oskrba osredotočena na posameznega bolnika glede na njegove

fiziološke, pa tudi socio-ekonomske posebnosti. Ločita se glede na to, kdo sprejema odločitve in po vlogi bolnika v celotnem procesu zdravstvene skrbi.



Slika 1: Razvoj modelov medicinske skrbi. (Povzeto po Karazivan P et al. 1)

»



## MODEL "NA BOLNIKA OSREDOTOČENA ZDRAVSTVENA OSKRBA"

Čeprav individualizacija zdravljenja ni več nov pristop, vseh mehanizmov še ne poznamo. Zavedati se je treba, da bo pristop toliko bolj uspešen, kolikor bolj natančno bodo poznane lastnosti bolnika oz. njegove posebnosti. Več kot bo podatkov o delovanju sistemov pri bolniku, več posebnosti bo mogoče prepoznati in lažje se bo izogniti škodljivemu delovanju npr. zdravil. Množično pridobivanje podatkov o posamezniku, njegovem profilu proteinov, presnovkov, lipidov, ... so omogočile napredne tehnologije "omik". Na tisoče podatkov, pridobljenih na ta način, že pomaga odkrivati, v čem se posamezniki razlikujemo med seboj, ka-

tere od teh razlik so vzrok za različno presnovo zdravil ali endogenih snovi ipd. Na ta način smo že prišli do novih bioloških označevalcev, ki bodo pozneje po korelaciji z bolezenskimi simptomi lahko postali diagnostični označevalci. Ti bodo osnova za bolniku prilagojeno laboratorijsko medicino (BPLM). V vsakem primeru gre pri tem za model v, ki ga imenujemo "patients focused/centered model" (model PF).

## RAZVOJ MODELA "BOLNIK KOT PARTNER"

A razvoj se tukaj ni ustavil. Že pred 20 leti se je izkazalo, da pasivna vloga bolnika pri zdravstveni obravnavi ni dovolj oziroma jo celo omejuje. Začel se je razvijati model "patient-as-partner" (model bolnik kot partner, model PP) in začelo se je razvijati partnerstvo z bolnikom. Bolnik se tukaj vključi v zdravstveno ekipo kot "ekspert" za svojo bolezen. S podatki kdaj, kako pogosto, kako močno ipd. se v njegovem primeru pojavljajo bolezenski simp-

tomi pomaga, uči in sodeluje z zdravstveno ekipo. Tako lahko sproti na vsaki stopnji obravnave sooblikuje zdravstvene odločitve. Model je zelo primeren za dolgotrajna zdravljenja, npr. pri kroničnih boleznih. Vendar je za uspeh modela PP treba bolnike mobilizirati, povabiti, motivirati, prepričati, da se aktivno vključijo ter jim v nadaljevanju pomagati z njim prilagojenimi pojasnili in navodili.

## VLOGA LABORATORIJSKE MEDICINE (LM) V MODELU "BOLNIK KOT PARTNER" IN KOMENTARJI LABORATORIJSKIH REZULTATOV

Specialist LM v modelu PP znotraj ekipe zdravstvenih delavcev sodeluje pri pojasnjevanju laboratorijskih rezultatov.

Tradicionalno vključuje laboratorijsko poročilo (report): izmerjeno vrednost, enote in območje referenčnih vrednosti (RV). Komentarji z razlago (angl. *Interpretative comments*, IC) so prav tako del poanaliznih aktivnosti vsake laboratorijske preiskave in tako obvezen del laboratorijskih storitev. Predvideva jih tudi standard ISO 15189, "vselej ko je to potrebno". IC omogoči pretvorbo laboratorijskega poročila v izvid, ki sledi klasični piramidi izgrajevanja zna-

nja: podatki-informacija-znanje-razumevanje. Priprava IC je torej kompleksen proces, ki zahteva poznavanje analita, analiznega procesa, pre- in poanaliznih variabilnosti in korelacijo meritev s kliničnim stanjem. Komentarji z razlago rezultatov (IC) so potrebni, ker v prvi vrsti prispevajo k varnosti bolnikov, saj so ugotovili, da so napake pogoste v post-post analizni fazi. Ankete so pokazale, da so tudi naročniki preiskav, posebno ob kompleksnih preiskavah (genetika, imunologija, ...), bolj zadovoljni, če je dodan komentar rezultatov. Pravzaprav je IC celo nujen pri kompleksnih preiskavah, če je bila uporabljena poseb- »

na (neharmonizirana) metoda, RV, ali meje za odločanje. Navsezadnje IC pomeni izpolnjevanje zahtev standarda in lahko predstavlja dodano vrednost za določen laboratorij. IC zagotovo povečajo učinkovitost oskrbe in zmanjšajo stroške zdravstva.

IC naj bi bil oblikovan kot predlog oziroma usmeritev za nadaljnje ukrepe, npr. dodatne preiskave, spremljanje določenega parametra, kako pogosto, itd.

Tehnično naj bi IC vključeval opis analitične posebnosti, posebnosti vzorca in značilnosti kombinacije rezultatov, povezanih z medicinskimi podatki, ter na koncu predloge, navodila za ukrepe.

Kaj potrebujemo za kakovosten IC:

- kakovosten rezultat,

- kakovostne RV,
- kakovostno osebje s potrebnimi znanji in izkušnjami (ustrezno izobraževanje, usposobljenost za svetovanje zdr.),
- kakovostne podatke o bolniku (posebnosti, socio-ekonomske okoliščine),
- komunikacijske sposobnosti razlagalca.

Delovna komisija pri IFCC (2) je izpostavila predvsem znanje in izkušnje specialista ter dostopnost kliničnih podatkov. Ker so lahko napačni IC celo nevarni, je bila za kakovost in harmonizacijo komentarjev z razlago imenovana delovna skupina pri IFCC, ki je leta 2016 podala prve usmeritve glede kakovosti IC. Predlagala je strukturo IC in načine za zagotavljanje kakovosti (zagotavljanje kompetenc specialista LM in oblika EQA programov za IC).

## PREDLAGANA SHEMA ZA ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI IC

1. Obseg  
EQA naj bi po priporočilih omenjene delovne skupine vključevala 10–24 kliničnih primerov na leto, in sicer:
  - a. realni klinični primer iz bolnišnične ali ambulantne prakse (tudi s področij družinske medicine, pediatrije ali gerontologije) z različno stopnjo kompleksnosti;
  - b. anonimizirani podatki naj bi vključevali starost in spol ter opis (kot ga običajno dobi LM), set meritev in dodatne informacije, če je treba.
2. Udeleženci. V ta EQA program so vključeni posamezniki in ne laboratoriji. Vključeni so vsi specialisti, ne glede na osnovno izobrazbo.
3. Izvedba naj bi potekala on-line.
4. Ocenjevanje: anonimizirane odgovore ocenjuje panel (4–7 članov), vsak član poda svojo oceno od 1 do 5, ocenjujejo se tehnično znanje, temeljitost klinične razlage ter jasnost pojasnil.

## IC V MODELU ZDRAVSTVENE OSKRBE "PARTNERSTVO Z BOLNIKOM"

Bolnik ima pravico, da izve svoje laboratorijske izvide, v modelu "Partnerstvo z bolnikom" pa mora imeti neposreden dostop do njih. Jasno je, da je treba komentarje laboratorijskih rezultatov, namenjenih bolnikom, prilagoditi. Samo če bo bolnik laboratorijske izvide razumel, lahko

kakovostno sodeluje. Morajo biti kratka, enostavna, jasna (brez medicinskih izrazov), v slikovni ali grafični obliki, ipd. »

## ZAKLJUČEK

Bolnik dobiva vse pomembnejšo (celo osrednjo) vlogo v procesu zdravstvene skrbi, ki je zaradi tega boljša še posebno pri dolgotrajnih zdravljenjih. To izhaja iz dejstva, da ima kronični bolnik veliko “eksperimentalnih podatkov” in veliko “empiričnega znanja”, ki mu pomaga “samo-upravljati” svojo bolezen. To so dragoceni podatki, iz katerih se lahko drugi v zdravstveni ekipi učijo in pridobivajo izkušnje. Po drugi strani takšen bolnik lahko soodloča o svoji zdravstveni oskrbi na osnovi svojih izkušenj, razmer

in možnosti, ki jih ima. Treba pa mu je omogočiti dostop do kliničnih podatkov (lahko z zamikom).

Vloga LM kot enega od partnerjev v takšni zdravstveni ekipi je vezana na pojasnila in komentarje k laboratorijskim izvidom. Ta morajo biti bolniku prilagojena, kar ni enostavno, vendar je to vložek LM v ta proces in večjo varnost ter zadovoljstvo bolnikov.

## LITERATURA

1. Karazivan P et al. The Patient-as-Partner Approach in Health Care: A Conceptual Framework for a Necessary Transition. *Academic Medicine*, Vol. 90, No. 4 / April 2015
2. Vasikaran et al.: Quality assurance of interpretative comments. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54(12): 1901–1911

# Mikro RNA kot novi biološki označevalci v bolniku prilagojeni laboratorijski medicini

**Barbara Ostanek**

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo

## UVOD

Mikro RNA (miRNA) so endogene, kratke, (cca. 22 nukleotidov dolge) enoverižne, nekodirajoče molekule RNA, ki so pomembne za posttranskripcijsko uravnavanje izražanja genov. Prva miRNA je bila odkrita leta 1993 pri *Caenorhabditis elegans* (1, 2). miRNA se vežejo na komplementarna zaporedja na 3' neprevedljivem delu tarčne informacijske RNA (mRNA) in v primeru popolne komplementarnosti povzročijo razgradnjo, v primeru delne komplementarnosti pa zaviranje translacije mRNA. Za prepoznavo mesta vezave na tarčni mRNA in s tem za specifičnost vezave je odgovorno zaporedje nukleotidov 2–8 v miRNA (2, 3). Izražanje miRNA je tkivno specifično in v človeških celicah so dokazali že preko 2600 različnih miRNA (1, 3). Možnosti uravnavanja izražanja genov z miRNA so izjemne, saj lahko ena miRNA vpliva na izražanje več sto mRNA, izražanje vsake mRNA pa lahko uravnava več miRNA (1, 3). Na osnovi izračunov predvidevajo, da se na 30–60 % sesalskih mRNA veže vsaj ena miRNA. Prav tako so dokazali, da igrajo miRNA pomembno vlogo v razvoju tkiv in uravnavanju številnih ce-

ličnih procesov, kot so: celična diferenciacija, proliferacija, presnova in apoptoza. Tako ne presenečajo dokazi o povezavi spremenjenega izražanja miRNA v celicah s patofiziologijo mnogoterih bolezni, npr. z različnimi vrstami raka, presnovnimi, nevrodegenerativnimi, srčnožilnimi in mišičnimi obolenji (4).

Poleg celičnih poznamo tudi izvencelične miRNA, ki so bile najprej odkrite v plazmi in serumu, te imenujemo tudi cirkulirajoče miRNA, pozneje pa še v številnih drugih telesnih tekočinah in izločkih. Izvencelične miRNA so presenetljivo stabilne, saj jih pred razgradnjo z RNA-zami ščiti vezava s proteini iz družine argonavtov (AGO2), z lipoproteini visoke gostote, lahko pa so vključene tudi v vezikle, med katere uvrščamo eksosome, mikrovezikle in apoptotična telesa. Fiziološka vloga izvenceličnih miRNA še ni povsem pojasnjena. Lahko predstavljajo odpadni produkt celic, vse več dokazov pa kaže, da so vpletene v medcelično komunikacijo (5).

## KLINIČNI POTENCIAL MIRNA

Celične, zaradi lažje dostopnosti in visoke stabilnosti pa še posebej izvencelične miRNA, so zanimive kot biološki označevalci za zgodnjo postavitev diagnoze, klasifikacijo, napoved izida bolezni in predvidevanje odziva na zdravljenje. Težava pri njihovi vpeljavi v vsakdanjo klinično pra-

kso je razhajanje rezultatov študij, ki pri isti bolezni ne kažejo nujno povezanosti z enakim naborom miRNA (1, 6). Vzrokov za to je več in so povzeti v Tabeli I, vključujejo pa tako lastnosti vzorca, predpripravo vzorca, metode merjenja in tudi obdelavo izmerjenih podatkov.

»

Še posebej velik izziv in potrebo po standardizaciji zaradi nizkih koncentracij izkazuje merjenje izvenceličnih miRNA. Pri merjenju cirkulirajočih miRNA se lahko pojavijo razlike med meritvami v serumu in plazmi; če uporabimo plazmo, je pomemben izbor antikoagulanta, najbolj priporočljiv je EDTA. Zaradi možnega sproščanja iz levkocitov in trombocitov lahko vpliva število krvnih celic, pomemben je čas od odvzema do centrifugiranja in način centrifugiranja, saj so razlike v profilu miRNA med s trombociti bogato in s trombociti revno plazmo, prepričati je treba hemolizo (2, 4, 5, 8, 9).

V eni izmed naših študij smo iskali miRNA v plazmi kot diagnostične označevalce za pomenopavzno osteoporozo. V članku so podrobno opisani izbor bolnic in preiskovank v primerjalni kontrolni skupini, odvzem in ravnanje

z vzorci, metoda izolacije in kvantifikacije miRNA. Kot potencialni diagnostični označevalec smo odkrili miR-148a-3p, in sicer so bile vrednosti višje pri osteoporoznih bolnicah, kar je v skladu s predhodnimi dokazi o njeni vlogi v zaviranju razvoja osteoblastov in spodbujanju razvoja osteoklastov (10).

miRNA imajo klinični potencial tudi kot nove terapevtske tarče. Z boleznijo povezano pretirano izražanje miRNA lahko namreč zavremo z uporabo miRNA zaviralcev, imenovanih antagomirji ali antimirR-ji. To so protismiselni oligonukleotidi, ki se vežejo na endogeno miRNA in izničijo njen učinek. Po drugi strani pa lahko pomanjkaje miRNA nadomestimo z eksogenim vnosom sintetične miRNA, t. i. miRNA mimikov (4).

**Tabela 1:** Dejavniki, ki vplivajo na izmerjene vrednosti miRNA (povzeto po (2, 4, 7-9))

<b>Predanalizna faza</b>	<p><b>Interindividualna variabilnost</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• spol</li> <li>• način življenja (kajenje, fizična aktivnost, prehrana)</li> <li>• spremljajoče bolezni</li> </ul> <p><b>Vzorec</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• vrsta vzorca (tkivo, vrsta telesne tekočine)</li> <li>• čas odvzema (cirkadialni ritem, na tešče)</li> <li>• procesiranje in shranjevanje vzorca do analize</li> </ul>
<b>Analizna faza</b>	<p><b>Izolacija RNA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• izbor metode izolacije RNA</li> <li>• kakovost in količina izolirane RNA</li> <li>• shranjevanje izolirane RNA</li> </ul> <p><b>Metoda kvantifikacije miRNA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• obratna transkripcija in kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času</li> <li>• miRNA mikromreža</li> <li>• miRNA sekvenciranje</li> </ul>
<b>Poanalizna faza</b>	<p><b>Izračun koncentracij miRNA iz surovih podatkov</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• normalizacija z uporabo enega ali nekaj endogenih referenčnih genov</li> <li>• normalizacija z uporabo enega ali nekaj eksogenih referenčnih genov</li> <li>• normalizacija z uporabo globalne sredine</li> </ul>



## ZAKLJUČEK

Povzamemo lahko, da so miRNA pomembni regulatorji izražanja genov in igrajo ključno vlogo v fizioloških procesih ter tudi v razvoju številnih bolezni. Zato imajo miRNA velik klinični potencial kot biološki označevalci in nova skupina terapevtskih tarč. Kot biološki označevalci so zaradi lažje dostopnosti še posebej zanimive izvencelične miRNA. Za izkoriščenje potenciala miRNA v posamezniku prilagojeni laboratorijski medicini je treba pridobiti nabor validiranih miRNA. Področje je še v začetnih fazah, težavo predstavlja velika spremenljivost rezultatov različnih študij, zato je treba izvesti nadaljnje študije na večjih skupinah preiskovancev ter standardizirati predanalizne, analize in poanalizne faze dela.

gojeni laboratorijski medicini je treba pridobiti nabor validiranih miRNA. Področje je še v začetnih fazah, težavo predstavlja velika spremenljivost rezultatov različnih študij, zato je treba izvesti nadaljnje študije na večjih skupinah preiskovancev ter standardizirati predanalizne, analize in poanalizne faze dela.

## LITERATURA

1. Bottani M, Banfi G, Lombardi G. The Clinical Potential of Circulating miRNAs as Biomarkers: Present and Future Applications for Diagnosis and Prognosis of Age-Associated Bone Diseases. *Biomolecules*. 2020;10(4).
2. Ntelios D, Georgiou E, Alexouda S, Malousi A, Eftimiadis G, Tzimagiorgis G. A critical approach for successful use of circulating microRNAs as biomarkers in cardiovascular diseases: the case of hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Fail Rev*. 2022;27(1):281-94.
3. Grillari J, Makitie RE, Kocijan R, Haschka J, Vazquez DC, Semmelrock E, et al. Circulating miRNAs in bone health and disease. *Bone*. 2021;145:115787.
4. Terrinoni A, Calabrese C, Basso D, Aita A, Caporali S, Plebani M, et al. The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med*. 2019;57(7):932-53.
5. Sohel MMH. Circulating microRNAs as biomarkers in cancer diagnosis. *Life Sci*. 2020;248:117473.
6. Wu Y, Li Q, Zhang R, Dai X, Chen W, Xing D. Circulating microRNAs: Biomarkers of disease. *Clin Chim Acta*. 2021;516:46-54.
7. Andersen GB, Tost J. Circulating miRNAs as Biomarker in Cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2020;215:277-98.
8. Lee I, Baxter D, Lee MY, Scherler K, Wang K. The Importance of Standardization on Analyzing Circulating RNA. *Mol Diagn Ther*. 2017;21(3):259-68.
9. Precazzini F, Detassis S, Imperatori AS, Denti MA, Campomenosi P. Measurements Methods for the Development of MicroRNA-Based Tests for Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3).
10. Bedene A, Mencej Bedrac S, Jese L, Marc J, Vrtacnik P, Prezelj J, et al. MiR-148a the epigenetic regulator of bone homeostasis is increased in plasma of osteoporotic postmenopausal women. *Wien Klin Wochenschr*. 2016;128(Suppl 7):519-26.

# Primeri predanalitskih neskladnosti

**Greta Štrakl**

Splošna bolnišnica Murska Sobota, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko SZKKLM, Delovna skupina za predanalitiko (DS-PRE)

Kakovost oskrbe pacienta je odvisna od kakovosti vseh informacij, ki jih zdravnik uporablja pri odločanju o zdravljenju. Več kot 70 % kliničnih odločitev temelji na informacijah, pridobljenih iz rezultatov laboratorijskih preiskav, zato je kakovost le-teh izjemno pomembna. Analiza in poročanje rezultatov, pridobljenih iz neustreznih in nekakovostnih vzorcev, lahko vodita do napak pri zdravniških odločitvah. Iz tega razloga je za natančno in pravočasno poročanje rezultatov pomembno prepoznati, popraviti in preprečiti napake v vsakem koraku celotnega postopka testiranja (1). Celotni postopek laboratorijskega testiranja lahko razdelimo na tri faze: predanalitsko, analitsko in poanalitsko. Predanalitska faza je še vedno glavni vir laboratorijskih napak (60–70%) večinoma jih je mogoče pripisati napačnemu ravnanju med odvzemom vzorcev, transportu in pripravi vzorcev za testiranje (1).

Odvzem krvi je ena najpogostejših diagnostičnih metod za zdravljenje in oceno tudi otroških bolezni in stanj. Uspešnost odvzema krvi pri otrocih je odvisna od tehničnih, psiholoških in pedagoških veščin ter poznavanja predanalitskih smernic in pasti. Otroci niso majhni odrasli. Pri njih se pogosto izvaja kapilarni odvzem krvi, pri čemer je hemoliza bolj pogosta kot pri venoznem odvzemu, prav tako je volumen vzorca manjši (3).

## PRIMER 1

Laboratorij je prejel vzorec EDTA krvi in krvi brez anti-koagulanta (za biokemijske preiskave) štiriletnega otroka. Vzorca krvi sta bila odvzeta v majhni, pediatrični epruveti z vijoličnim (EDTA kri) in rumenim zamaškom (kri brez anti-koagulanta). Obe epruveti sta bili preplepljeni s (pravljnimi) podatki malega pacienta. Med naročenimi preiskavami so bili KKS, glukoza, urea, kreatinin, elektroliti (Na, K, Cl) in CRP.

Majhen skupni volumen krvi pri dojenčkih in otrocih omejuje količino krvi, ki jo je mogoče varno odvzeti pri pediatričnem bolniku. Volumen vzorca in predanalitske spremenljivke vplivajo na kakovost laboratorijskih preiskav. Če upoštevamo pediatrično populacijo, imata med predanalitskimi spremenljivkami pomembno mesto starost bolnika in predvsem odvzem ter ravnanje z vzorci pred analizo. Pri otrocih je odvzem vzorcev tehnično zelo težak in zahteva posebne veščine, usposabljanje in izkušnje. Ena od posledic težkega odvzema je, da dobimo hemolizirane ali strjene vzorce in majhne količine krvi. Nezadostna količina krvi, odvzeta v epruvete z antikoagulantom, lahko povzroči napačne rezultate zaradi redčenja vzorca. Hemolizirani vzorci pri novorojenčkih povzročajo motnje pri merjenju bilirubina. Pri otrocih je težavno tudi zbiranje vzorcev urina (2). Neskladnosti vzorca, ne glede na to, ali so povezane s kakovostjo ali količino, imajo velik vpliv na rezultate, kar lahko vodi do številnih neželenih kliničnih izidov, ki ogrožajo bolnikovo varnost. Delovna skupina za predanalitiko pri SZKKM pripravlja priporočila in zbira praktične primere predanalitskih napak. V nadaljevanju je predstavljen nekaj od številnih zanimivih primerov iz vsakdanje prakse, ki se pogosto pojavljajo pri pediatričnih vzorcih.

Epruveta z vijoličnim zamaškom je bila takoj prenešena v hematološki laboratorij. Analiza KKS je bila opravljena ročno po nekajkratnem mešanju krvi. Epruveta z rumenim zamaškom je bila prenešena v biokemijski laboratorij in centrifugirana v centrifugi za pediatrične vzorce.

Meritev KKS ni bilo mogoče opraviti. Laboratorijsko osebje je pri ročni analizi KKS delno odstranilo etiketo s po- »



datki o pacientu. Pri tem je ugotovilo, da je na dnu epruvete gel. Epruveta je bila sicer zamašena z vijoličnim zamaškom. Epruveta v biokemijskem laboratoriju je bila pregledana po centrifugiranju (pred biokemijskimi preiskavami); za-prta je bila z rumenim zamaškom, v njej ni bilo gela. Po odstranitvi etikete je bil na epruveti najden zapis EDTA.

## PRIMER 2

Laboratorij je istočasno prejel vzorca krvi za hematološke in biokemijske preiskave dveh različnih otrok. Vzorca krvi za biokemijske preiskave sta bila odvzeta v majhni, pediatrični epruveti z gelom in rumenim zamaškom (kri brez antikoagulant). Obe epruveti sta bili pravilno označeni z identifikacijo malih pacientov in napolnjeni z enako, a majhno količino krvi. Za oba mala pacienta so bile naročene enake preiskave (KKS, glukoza, kreatinin in CRP).

Meritve KKS, CRP, kreatinina in glukoze za prvega pacienta so bile opravljene v celoti. Za drugega sta bila poleg KKS izmerjena CRP in kreatinin, za glukozo je bilo vzorca premalo. Laboratorijsko osebje je namesto rezultata za glukozo označilo kazalnik kakovosti predanalitskih neskladnosti (Premalo vzorca za naročene preiskave) in o tem obvestilo naročnika.

Naročnik, ki mu je bila javljena neskladnost za drugega pacienta (premalo vzorca za meritve glukoze), se z navedbo laboratorijskega osebja ni strinjal. Obrazložil je, da sta imela oba mala pacienta enako količino krvi v epruveti in naročene enake preiskave, pri čemer je laboratorij za prvega pacienta podal vse rezultate, za drugega pa ne. Naročnik je želel pojasniti, zakaj je laboratorij navedel premalo vzorca kot razlog zavrnitve meritve glukoze.

## PRIMER 3

Laboratorij je prejel vzorec krvi brez antikoagulant za biokemijske preiskave in vzorec z inhibitorjem glikolize za določitev laktata 63-letnega bolnika. Vzorci so bili poslani iz urgentnega centra. Med naročenimi preiskavami so bili

Laboratorijsko osebje je kontaktiralo oddelek in prosilo za pojasnitev okoliščin odvzema krvi. Izkazalo se je, da sta bili obe epruveti odmašeni, po odvzemu krvi pa napačno zamašeni – prišlo je do zamenjave zamaškov. Laboratorijsko osebje je prav tako sumilo na prelivanje krvi iz ene v drugo epruveto, zato je oba vzorca zavrnilo. Z oddelkom je bil dogovorjen ponovni odvzem krvi.

Količina seruma po centrifugiranju krvi je odvisna od hematokrita. Hematokrit v krvi predstavlja volumski odnos med količino krvnih celic in količino krvne plazme. Glede na številčno vrednost oz. razmerje eritrocitov, trombocitov in levkocitov v krvi povzemamo, da predstavlja hematokrit kar delež eritrocitov v krvi. Zato je hematokrit najbolj odvisen od števila in velikosti eritrocitov v krvi, starosti, spola, pa tudi od bolezenskih in drugih stanj (dehidracija, driska, bruhanje, znojenje). Običajno je večji delež eritrocitov (celic) v krvi povezan z manjšim deležem krvne plazme in obratno.

Pri prvem pacientu je bil izmerjen hematokrit 0,37 oz. 37 %, število eritrocitov pa  $3,99 \times 10^{12}/L$ . Pri drugem pacientu je bil izmerjen hematokrit 0,51 oz. 51 %, število eritrocitov pa  $4,66 \times 10^{12}/L$ . Kadar pripravljamo serum pediatričnih vzorcev v majhnih epruvetah, iz majhne količine krvi, lahko vsaka razlika v hematokritu vpliva na količino pridobljenega seruma. V primeru drugega pacienta je bila zaradi višjega hematokrita količina seruma za nekaj  $\mu L$  manjša kot pri prvem, ravno toliko, da meritve glukoze ni bilo več mogoče opraviti.

urea, kreatinin, elektroliti (Na, K, Cl), bilirubin in CRP (Tabela 1). Izmerjeni sta bili nenormalno visoka vrednost natrija (nad merilnim območjem) in nizka vrednost kalcija (pod merilnim območjem).

»

Tabela 1: Rezultati laboratorijskih analiz

Preiskava	Plazma	Serum
Bilirubin	28,5 µmol/L	28,9 µmol/L
Na	<b>&gt;196 mmol/L</b>	141 mmol/L
K	3,76 mmol/L	3,92 mmol/L
Cl	103 mmol/L	108 mmol/L
Kalcij	<b>&gt;0,05 mmol/L</b>	1,97 mmol/L
Urea	5,8 mmol/L	5,9 mmol/L
Kreatinin	96 µmol/L	99 µmol/L
CRP	6 mg/L	6 mg/L
Laktat	1,5 mmol/L	

Pri preverjanju originalnih primarnih vzorcev (analizirani so bili vzorci v sekundarnih epruveh) je bilo ugotovljeno, da sta bila oba sekundarna vzorca odlita iz primarne epruvete za laktat. Primarna serumska epruveta je bila nedotaknjena. Vzorec seruma je bil ponovno analiziran iz primarne epruvete.

V vzorcu seruma so bile izmerjene bistveno spremenjene vrednosti za natrij in kalcij; laboratorij je s ponovno analizo primarnih vzorcev preveril vzrok za nastalo napako. Po ponovni analizi ustreznega vzorca je bil izdan laboratorijski izvid.

## PRIMER 4

Oddelek za transfuzijsko medicino je prejel vzorec dve leti starega pacienta za koagulacijske preiskave, brez predhodno dokumentirane motnje koagulacije. Rezultati so zbrani v Tabeli 2.

Pri otroku je bila načrtovana odstranitev timpanostomskih cevk po anestezijskem postopku, predoperativni koagulacijski testi pa so pokazali podaljšan protrombinski čas, aktiviran delni tromboplastinski čas in trombinski čas, s fibrinogenom in antitrombinom v referenčnih intervalih. »

Tabela 2: Rezultati laboratorijskih analiz

PČ	↑↑↑
APTČ	↑
TČ	↑
Fibrinogen	N
Antitrombin	N

Otrok je bil predhodno že obravnavan v tem laboratoriju. Takrat so bili rezultati koagulacijskih testov v mejah normale. Iz anamnestičnih in kliničnih podatkov je bila izključena prirojena motnja koagulacije, z nadaljnjo preiskavo pa so bili izključeni tudi neuskklajenost vzorca, prisotnost strdka in nenamerno zaužitje peroralnega anti-koagulanta, kontaminacija s heparinom ali pomanjkanje vitamina K. Sestra, ki je odvzela vzorce, je bila zmedena in ni pojasnila, kako je potekal odvzem, je pa povedala, da je odvzela istočasno tudi vzorec z EDTA.

Zaradi suma na prenos EDTA med odvzemom krvi je bil isti dan odvzet še en vzorec, vsi testi so bili ponovno opravljeni. Rezultati vseh testov so bili v referenčnih intervalih (4).

Zavrnitev vzorca z večkratnim odvzemom krvi je vedno neželena posledica neskladnosti vzorca in predanalitskih napak, zlasti pri najbolj ranljivi populaciji – otrocih. Preprečevanje napak je treba načrtovati ob upoštevanju značilnosti vzorcev, poslanih v laboratorij. Vsak medicinski laboratorij mora v skladu s priporočili in smernicami občasno preveriti svoje lastne postopke. Z uporabo kazalnikov kakovosti je treba ugotoviti, kje se napake pojavljajo, in na podlagi tega sprejeti preventivne in korektivne ukrepe ter izvajati izobraževanje nelaboratorijskega osebja, ki odvzema vzorce, in tako zmanjšati tveganja napačnih rezultatov zaradi neustreznih predanalitskih postopkov.

## LITERATURA

1. Lippi G, Baird GS, Banfi G, et al. Improving quality in the preanalytical phase through innovation, on behalf of the European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(4):489-500
2. Coffin CM, Hamilton MS, Pysher TJ, et al. Pediatric laboratory medicine: current challenges and future opportunities. *Am J Clin Pathol.* 2002;117(5):683-690.
3. Oğuz EF, Kara F, Kızılgün M. Preanalytical Error Sources: Pediatric Laboratory Experience. *Istanbul Medical Journal.* 2017;18:28-31.
4. Banković Radovanović P, Živković Mikulčić T, Simović Medica J. Unexpected abnormal coagulation test results in a 2-year-old child: A case report. *Biochem Med.* 2020;30(1): 011002.





Pod pokroviteljstvom / Under the auspices of:

**EFLM**  
EUROPEAN FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY  
AND LABORATORY MEDICINE

**IFCC**  
International Federation  
of Clinical Chemistry  
and Laboratory Medicine

05

Povzetki  
prispevkov na  
6. slovenskem  
kongresu  
klinične kemije  
in laboratorijske  
medicine v  
Portorožu

## POVZETEK PLENARNEGA PREDAVANJA

### PL-1

#### *Future of Laboratory Medicine with emerging new technologies and artificial intelligence*

**Sergio Bernardini**

*University of Rome Tor Vergata, Department of Internal Medicine & Department of Clinical Biochemistry, Rome, Italy*

*E-mail: bernardini@med.uniroma2.it*

It is essential to look to the future in order to proactively support the quality and application of new technologies in Laboratory Medicine.

The "Internet" has led to proactive and better informed patients. This is supported by current opinion which has the emphasis for the future placed on patient centred effective practice. Chronic disease prevention, increased longevity of the population and patient demand for direct-to-consumer testing has already disrupted practice and will continue to change the landscape of Laboratory Medicine. The consumer is now clearly in the centre of the health care strategy of P4 medicine (predictive, preventative, personalised and participatory medicine).

We continue to see significant advances in technology, and in response the role of the laboratory and the laboratory professional continues to evolve. New working models between academics, hospitals and in vitro diagnostic (IVD) companies (translational medicine, companies on campus) need to be established to support the quality and harmonisation of medical tests.

In particular the use of Data Science and its multiple sub-fields is increasing and will participate to the transformation of Laboratory Medicine. These technologies have the potential to address some unmet clinical needs: they might enhance personalized patient care and improve efficiencies in laboratory processes and care pathways. However, such evolution is in its infancy, and the balance between usability and desirability remains a matter of concerns. Some key elements to facilitate the integration of Data Science to laboratory practices are the ability to multidisciplinary validation, the guidance for best practices by international scientific societies and the addressing of ethical challenges raised by artificial intelligence and machine learning. In that respect, prospective validation of AI systems are needed to ensure their reliability and integration in an adequate body of positive soft law regulations should be considered as being of the essence to address these ethical issues.

## POVZETKI VABLJENIH PREDAVANJ

### IL-1

#### *The potential of liquid biopsy in the management of cancer patients*

**Evi Lianidou**

*National and Kapodistrian University of Athens, Department of Chemistry, Laboratory of Analytical Chemistry, Analysis of Circulating Tumor Cells (ACTC) Lab, Athens, Greece*

*E-mail: lianidou@chem.uoa.gr*

Over the last decade, liquid biopsy has gained much attention as a powerful tool in personalized medicine, since it enables monitoring cancer evolution and follow-up of cancer patients in real time. Through minimally invasive procedures, liquid biopsy provides important information through the analysis of Circulating Tumor Cells (CTCs), and circulating tumour-derived material like circulating tumour DNA (ctDNA), circulating miRNAs (cfmiRNAs) and extracellular vesicles (EVs). CTCs and ctDNA analysis has already an important impact on the prognosis, detection of minimal residual disease (MRD), treatment selection and monitoring of cancer patients, while recent data show also its potential for early cancer diagnosis. Numerous clinical trials include now a liquid biopsy arm, and functional studies mainly based on CTC derived cell-lines and CTC derived explants (CDx)

provide important insight on the metastatic process. The recent findings in the field of liquid biopsy and the benefits and main clinical applications of CTC and ctDNA analysis in solid tumors are summarized in this presentation.

### IL-2

#### *Plazemske RNA v proučevanju aterogeneze Plasma RNAs in study of atherogenesis*

**Darko Černe**

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

*E-mail: darko.cerne@kclj.si*

Cell-free nucleic acids analysis has recently emerged as a novel research tool in atherosclerosis practice and research. It offers diagnosis and prognostic evaluation of acute coronary syndrome, prediction of cardiovascular disease, non-invasive early detection of atherosclerosis, and study of novel pathological mechanisms of atherogenesis in vivo. Various issues of treatment of atherosclerosis in vivo are being addressed as well. We hypothesised that, in patients with coronary atherosclerosis, it is possible to measure plasma mRNA levels from genes responsible for plaque development and

destabilization. We evaluated and optimised available methods for RNA isolation, mRNA transcription and quantitative PCR, in order to achieve reliable mRNA quantification. mRNA level was possible to quantify from plasma of patients with coronary atherosclerosis, as well as from healthy volunteers, from genes encoding cathepsin S, cathepsin B, CD40 molecule, monocyte chemoattractant protein 1, death-associated protein kinase 1, matrix metalloproteinase 9, vascular cell adhesion molecule 1 and phosphoglycerate kinase 1 (reference gene). Analytical between-run imprecision of average threshold cycle, expressed as coefficient of variation, was below 2 %. Importantly, this offers a unique simultaneous measurement of mRNA and protein levels in a single plasma sample as a new research tool in the study of atherogenesis.

1. Mijovski MB, Boc V, Fonovic UP, Marc J, Blinc A, Kos J et al. Increased Plasma Cathepsin s at the Time of Percutaneous Transluminal Angioplasty is Associated with 6-months' Restenosis of the Femoropopliteal Artery. *J Med Biochem.* 2018;37(1):54-61.
2. Cerne D, Bajalo JL. Cell-free nucleic acids as a non-invasive route for investigating atherosclerosis. *Curr Pharm Des.* 2014;20(31):5004-9.
3. Mirjanic-Azaric B, Rizzo M, Sormaz L, Stojanovic D, Uletilovic S, Sodin-Semrl S et al. Atorvastatin in stable angina patients lowers CCL2 and ICAM1 expression: pleiotropic evidence from plasma mRNA analyses. *Clin Biochem.* 2013;46(15):1526-31.

### IL-3

## RNA zunajceličnih veziklov kot biološki označevalci razvoja sladkorne bolezni tipa 1 *RNA from extracellular vesicles as biomarkers of type 1 diabetes*

Tine Tesovnik<sup>1</sup>, Jernej Kovač<sup>1</sup>, Maruša Debeljak<sup>1</sup>, Tadej Battelino<sup>2,3</sup>, Katarina Trebušak Podkrajšek<sup>1,4</sup>

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

<sup>2</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove, Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Ljubljana, Slovenija

E-mail: tine.tesovnik@kclj.si

Sladkorna bolezen tipa 1 (SBT1) je metabolna bolezen pomanjkanja lastnega inzulina, ki jo povzroči avtoimunsko uničenje celic beta trebušne slinavke. Osebe s SBT1 posledično potrebujejo zahtevno določanje ravni krvnega sladkorja, saj lahko le tako preprečijo nastanek zapletov SBT1. Nastanek avtoimunskega procesa, ki privede do uničenja celic beta, katere proizvajajo inzulin, še vedno ni pojasnjen. Večina preiskav se osredotoča na genetske in okoljske dejavnike tveganja razvoja bolezni, vendar pa je najverjetnejši vzrok avtoimunosti napaka v medcelični komunikaciji, kjer igrajo

pomembno vlogo tudi zunajcelični vezikli (ZV). ZV so 10-1000 nm velike, mehurčkom podobne strukture, ki jih v našem organizmu v medcelično izločajo celice z namenom medcelične komunikacije in prenosa molekul. V naši preiskavi smo preiskovali značilnosti in vlogo ZV pri osebah s SBT1 [1]. V prvi fazi naše raziskave smo izolirali ZV krvne plazme in s elektronsko mikroskopijo dokazali obstoj ZV s proteini, značilnimi za celice beta. V naslednjem koraku smo s sekvenciranjem naslednje generacije in bioinformatično analizo opredeli značilno izražene mikroRNA (miRNA) molekule ZV krvne plazme pri preiskovancih z novoodkrito SBT1, 10-let trajajočo SBT1, transplantirancih Langerhansovih otočkov in zdravih preiskovancih. Sledila je opredelitev imunomodulatorne funkcije izbranih miRNA z različnim izražanjem pri SBT1 in propadu celic beta. Dokazali smo, da se miRNA dostavljene z ZV kopičijo v krvnih fagocitih in lahko povzročijo povečano citotoksičnost in proliferacijo celic imunskega sistema ter povečano sproščanje proinflatronih citokinov. Izsledki naše raziskave kažejo na pomembno vlogo ZV in njihovih miRNA pri regulaciji delovanja imunskega sistema in razvoju avtoimunosti SBT1 [1].

**Glavne besede:** zunajcelični vezikli, miRNA, sladkorna bolezen tipa 1

1. Tesovnik T, Kovač J, Pohar K, Hudoklin S, Dovč K, Bratina N, idr. Extracellular Vesicles Derived Human-miRNAs Modulate the Immune System in Type 1 Diabetes. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:202.

### IL-4

## Mitohondrijska DNA kot bioznačevalec v diagnostiki raka prostate

### *Mitochondrial DNA as a biomarker in prostate cancer diagnostics*

Irena Prodan Žitnik<sup>1</sup>, Iztok Ditz<sup>2</sup>, Tomaž Smrkolj<sup>2</sup>, Joško Osredkar<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

E-mail: irena.prodan-zitnik@ffa.uni-lj.si

Rak prostate je v Sloveniji najpogostejša oblika raka pri moških. Zgodnje odkrivanje je bistvenega pomena za uspešno zdravljenje in zmanjšanje umrljivosti. Smernice Evropskega urološkega združenja za diagnostiko raka prostate vključujejo določanje prostata specifičnega antigena (PSA) in digitalni rektalni pregled, ob pozitivnem rezultatu pa še magnetno resonančno preiskavo (MRI) in v primeru sumljivih lezij biopsijo prostate s histopatološkim pregledom za potrditev suma na maligno obolenje. PSA ima nizko diagnostično specifičnost in njegova široka uporaba v zadnjih desetletjih je privedla do prekomernega diagnosticiranja in prekomernega zdravljenja raka prostate, zato se je pojavila potreba po novih diagnostičnih označevalcih, s katerimi bi lahko odkrili bolnike s klinično pomembnim rakom prostate in zmanjšali delež nepotrebnih biopsij.



Znano je, da mutacije v mitohondrijski DNA (mtDNA) pomembno prispevajo h kancerogenezi pri številnih vrstah raka. 3,4 kb dolga delecija področja mtDNA, ki kodira nekatere podenote NADH dehidrogenaze in nekatere tRNA, je obetaven bioznačevalec v diagnostiki raka prostate. Povišane vrednosti mtDNA z delecijo so prisotne v malignih celicah prostate, ne pa tudi v zdravih celicah ali pri benignih spremembah prostate, npr. pri hiperplaziji ali vnetju. Zaradi visokega števila kopij mtDNA, lahko delecijo določamo v izvencelični DNA v plazmi. Test je namenjen moškim nad 45. letom starosti, s koncentracijo PSA do 10 µg/L, pri katerih lahko rezultat pomembno prispeva k odločitvi za biopsijo. Klinične raziskave so pokazale, da diagnostična občutljivost testa znaša 92%, specifičnost 71% in negativna napovedna vrednost 96-100%, zato predstavlja učinkovito orodje za prepoznavo klinično pomembnega raka prostate, s katerim bi lahko zmanjšali delež nepotrebnih biopsij.

#### IL-5

### Leadership & Team Development: Success Together

**Pradeep K. Dabla**

Maulana Azad Medical College, G. B. Pant Institute of Postgraduate Medical Education & Research (GIPMER), Department of Biochemistry, Govt. of Delhi, India  
E-mail: pradeep\_dabla@yahoo.com

Team is described simply as “a group of people who are working through collective endeavour toward a common goal”. Effective team working is an essential ingredient for any organisational success. Successful teams can help transform an organisation, increase outputs and deliver on organisational objectives. It is crucial in supporting how we blend the invaluable skills, capabilities, knowledge, experience and diversity of staff to develop a new culture and vision with leadership and foremost participation at its heart. This topic covers range of attributes and real time model for successful teamwork in context of IFCC-TFYS.

International Federation of Clinical Chemistry & Laboratory Medicine (IFCC) recognized the need for a support group to help young scientists for promoting the essential contribution of laboratory medicine at the centre of healthcare. Thus to address these challenges, Task Force - Young Scientists (TFYS) was constituted in 2010. The aim of TFYS is to ensure that young scientists make a significant and growing contribution to the activities of IFCC and other National programmes. IFCC-TFYS able to cross the barrier and created a strong young scientists support group involving more than 30 global IFCC member countries covering

global regions. We use modern information technology & social media to establish networks and facilitating the communication, 24/7 using Facebook, Twitter, Linked In and others. We partnered with other National and International societies to deliver educational workshops, trainings, mentorship programmes, webinars to learn perspectives & principles of Laboratory Management & Leadership namely “IFCC-TFYS Survey”, “IFCC-TFYS Mentorship Programme”, “Research Booklet”, “Young Scientists Awards & Grants”, Webinars and Lab-Surfing. TFYS is working with commitment to help the new generation facing challenges in the field of laboratory medicine. Thus, there are different crucial elements of team work such as composition of teams, working together; motivation and the leadership within teams that contribute to develop a quality results successfully.

For more Information: <https://www.ifcc.org/task-force-young-scientists-web-pages/>

#### IL-6

### IFCC TFYS Networking with millennials, preparing for the future

**Santiago Fares-Taie**

Laboratorio Fares Taie, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina  
E-mail: sfaresstaie@hotmail.com

Millennials will comprise the majority of the workforce by 2025.

Identifying the needs of this generation and designing programmes to fulfill these needs is crucial to train the future leaders.

Some characteristics of this generation are inclusivity, entrepreneurial drive, collaboration and eager to learn. Following these attributes, and data from surveys, the IFCC Task Force Young Scientists (TFYS) is constantly designing programmes and activities according to the actual requirements.

During the lecture you will find out the importance of having Young Scientists groups (local, regional and international), promoting participation and commitment in the design and implementation of activities.

Moreover, you will learn about the different activities and programmes available in the IFCC TFYS: Lab-Surfing.com, PSEP, Webinars, Mentorship programme, Research booklet, YS FORUM, Leadership workshop, LiveMyLab among others.

## IL-7

**Kakšne možnosti / orodja za izobraževanje nudi EFLM mladim v laboratorijski medicini?****What educational tools and resources does EFLM offer to young scientists in Laboratory Medicine?****Evgenija Homšak**

Univerzitetni klinični center Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Maribor, Slovenija

E-mail: Evgenija.HOMSAK@ukc-mb.si

Evropsko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (EFLM) je ključna strokovna organizacija za področje klinične kemije in laboratorijske medicine, ki združuje in povezuje strokovna nacionalna združenja (NZ) in njihove člane znotraj Evrope. Strokovnjaki iz NZ se preko različnih vlog aktivno vključujejo in delujejo v različnih odborih in delovnih skupinah. Strokovni odbor (Professional Committee) (C-P) skrbi za prepoznavnost poklica in zastopa strokovne interese specialistov laboratorijske medicine po vsej Evropi preko vodenja registra evropskih specialistov (EuSpLM), pripravlja in skrbi za učni načrt (EFLM Syllabus) kot temelj specialističnega izobraževanja in skupnega izobraževalnega okvirja (Common Training Framework), ki omogoča harmonizacijo stroke na osnovi sprejetih izobraževalnih standardov (EoS) za članice EU/EFLM. Pomembno vlogo ima tudi pri vodenju EFLM akademije, ki omogoča njenim članom številne ugodnosti v smislu izobraževanja in profesionalnega razvoja. Cilj prizadevanj EFLM in C-P je doseganje EoS v vseh državah EFLM in dvig ravni strokovnega znanja in veščin na vseh področjih laboratorijske medicine. Za doseg tega cilja je EFLM v okviru delovanja svojih strokovnih enot razvilo več orodij in možnosti za dodatno izobraževanje in usposabljanje: podiplomske tečaje (Biostatistika, Priprava strokovnega članka, Veščine vodenja), projekt EFLMLabX izmenjave praktičnih znanj in veščin preko spletne platforme EFLM (<https://efmlabx.eflm.eu/en>), kjer lahko potencialni uporabniki (specializanti in specialisti) iščejo in se prijavijo za prakso/obiske/raziskave v različnih laboratorijih/institucijah po državah EFLM; različne spletne strokovne seminarje; Syllabus tečaje (Syllabus Courses) z več kot 350 posnetimi predavanji, ki zajemajo celotno tematiko EFLM Syllabusa ter vsa področja laboratorijske medicine in so pomembno dodatno učno orodje za specializante/specialiste za njihov profesionalni razvoj.

## IL-8

**Sekcija mladih pri SZKKLM-vizija za prihodnost****YS section of the SZKKLM – the vision for the future****Rok Kogovšek**

Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik, Slovenija

E-mail: rok.kogovsek@klinika-golnik.si

Promocija laboratorijskega dela ter motiviranje in spodbujanje mladih strokovnjakov s področja laboratorijske medicine, k aktivnemu sodelovanju v združenjih in zbornici kot tudi na samem delovnem mestu, je ena izmed pomembnih aktivnosti, ki pripomorejo k širitvi prepoznavnosti stroke in njenemu nadaljnjemu razvoju. Z željo po večji prepoznavnosti SZKKLM med mladimi in njihovo večjo vključenostjo smo na študente študijskega programa Laboratorijska biomedicina ter člane združenja naslovili anketo o njihovem videnju SZKKLM in predlogih za izboljšanje. V anketi je sodelovalo 62 oseb, od tega 44 članov združenja. 29 anketirancev je bilo študentov. Na vprašanje, kako dobro poznajo SZKKLM, je večina anketirancev odgovorila, da slabo do zmerno. S slabo, so poznavanje ocenili večinoma nečlani združenja. Na vprašanje o poznavanju aktivnosti povezanih z mladimi v Evropski zvezi klinične kemije in laboratorijske medicine (EFLM) in Mednarodni zvezi za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (IFCC) ter o možnostih/orodjih, ki jih ponujata, je večina odgovorila, da ne ve ničesar oziroma da tega ne spremlja. (1,2,3) Pri vprašanju o vključenosti mladih v SZKKLM večina anketirancev meni, da so mladi slabo do zmerno vključeni v dejavnosti združenja ter da bi le-to morali povečati. Idejo o ustanovitvi sekcije mladih podpira več kot polovica vprašanih, večina teh s pritrdilnim odgovorom, bi bila pripravljena zmerno do zelo aktivno v njej tudi sodelovati. Glede na rezultate ankete in po vzoru EFLM in IFCC bi tudi v SZKKLM lahko ustanovili skupino/sekcijo mladih. Njen namen bi bil, v prvi vrsti, osveščanje mladih članov in študentov o aktivnostih doma in po svetu ter njihovo povezovanje. Zato bi bilo, tudi glede na rezultate ankete, poleg spletne strani, smiselno vpeljati dodaten komunikacijski kanal.

1. Bauçà JM, Imperiali CE, Robles J, Díaz-Garzón J, Vuljanic D, Begovic E, et al. Thoughts and expectations of young professionals about the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). Clin Chem Lab Med [Internet]. 2020 [cited 2022Apr20];59(1):71–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32628627/>
2. European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) [Internet]. Task Group: Young Scientists; [cited 2022Apr20]. Available from: <https://www.eflm.eu/site/page/a/1725>
3. The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) [Internet]. Task Force Young Scientists; [cited 2022Apr20]. Available from: <https://www.ifcc.org/task-force-young-scientists-tf-ys/>

## IL-9

### Pristopi personalizirane medicine za raziskovanje in uporabo novih biomarkerjev

#### *Personalised medicine approaches for investigation and application of new biomarkers*

Vesna Gorenjak

Lek Pharmaceuticals d.d., Sandoz Development Center Slovenia, Slovenia

E-mail: gorenjak.vesna@gmail.com

Biomarkers are one of the crucial elements in the implementation of new risk prediction and prevention strategies against common chronic diseases. Personalised medicine developed sophisticated approaches, including “-omics” methodologies, to identify biomarkers linked with common diseases risk factors and molecular pathways. Inspired by diverse genetic and epigenetic tools that help to elucidate complex mechanisms of gene regulation, we investigated regulatory pathways related to different risk factors for chronic diseases and molecules, commonly involved in pathological onsets.

The three main molecules of our interest were triggering receptors expressed on myeloid cells (TREM2), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and telomere length (TL) and were studied mainly in the supposed healthy population of the STANISLAS Family Study, a 10-year longitudinal cohort. The employment of diverse methodologies for the investigation of common chronic diseases risk factors and pathways provided new diagnostic markers and generated results, which could help to improve the diseases risk prediction based on the individual genetic “make-up”:

The investigation of genetic variants, located in the region of the TREM2 gene identified new risk allele for inflammatory diseases and atherosclerosis. The use of an epigenome-wide association studies (EWAS) unravelled novel epigenetic biomarkers, related to common diseases risk factors: central obesity and increased lipid levels, as well as VEGF-A concentrations. Association studies revealed common regulation pathways between VEGF-A (protein and mRNA isoforms) and cytokines (IL-4, MCP1, EGF, IL-1 $\alpha$  and IL-6), important mediators of common physiological pathways of the majority of chronic diseases. Finally, through association of genetic variants related to VEGF-A levels with TL attrition (calculated as a ratio between leukocyte TL and muscular TL), a genetic variant that could present a common denominator of chronic diseases has been discovered.

The increasing knowledge of genetic regulation involved in molecular processes that present higher risk for chronic diseases is intended to serve us in early diagnostics of individuals with high potential for acquiring a chronic disease. This “premature” tests could help to establish early preventive therapies and thus decrease the overall prevalence of common chronic diseases.

## IL-10

### Prepoznavanje kandidatnih mikroRNA, vpletenih v razvoj in napredovanje nefropatije pri bolnikih s Fabryjevo boleznijo

#### *Identification of candidate microRNAs associated with development and progression of nephropathy in Fabry disease patients*

Tina Levstek

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Ljubljana, Slovenija

E-mail: tina.levstek@mf.uni-lj.si

Fabryjeva nefropatija je eden najpomembnejših vzrokov za zgodnjo obolevnost in umrljivost bolnikov s Fabryjevo boleznijo (FB). Trenutni označevalci ledvične funkcije so pozni pokazatelji ledvične okvare in ne omogočajo napovedi poteka bolezni. MikroRNA (miRNA) so nekodirajoče RNA, ki vplivajo na številne celične funkcije preko uravnavanja izražanja genov. Njihovo spreminjanje raven so dokazali pri številnih ledvičnih boleznih. Zato je bil namen raziskave prepoznati tiste miRNA, ki vplivajo na razvoj in napredovanje Fabryjeve nefropatije. V raziskavo je bilo vključenih deset bolnikov s FB in deset po starosti in spolu ujemajočih kontrolnih preiskovancev. Bolnike smo razdelili v dve skupini glede na ocenjeno hitrost glomerulne filtracije. Najprej smo z velikostno izključitveno kromatografijo iz vzorcev urina izolirali zunajcelične vezikle, iz katerih smo nato izolirali miRNA. S kvantitativnim PCR in komercialno dostopnimi paneli smo določili raven 87 miRNA. Ugotovili smo, da se je raven miR-222-3p, miR-221-3p, let-7i-5p, miR-21-5p in miR-365a-3p med bolniki s FB s stabilno ledvično funkcijo in kontrolnimi preiskovanci razlikovala za več kot 1,5-krat ter je bila hkrati tudi statistično značilno različna. Med bolniki z napredujočo nefropatijo in kontrolnimi preiskovanci pa so to bile miR-10b-5p, miR-22-3p, let-7f-5p, miR-30a-5p, miR-30c-5p, miR-30d-5p, miR-15a-5p, miR-204-5p in miR-21-5p. Izmed teh miRNA smo izbrali sedem miRNA, katerih raven bomo določili na večji kohorti bolnikov in ujemajočih kontrolnih preiskovancev. Kronološka korelacija ravni miRNA pri bolnikih s FB, ki imajo različno hitrost napredovanja nefropatije, bi lahko omogočila opredelitev tistih dejavnikov, ki so pomembni za razvoj oz. dinamiko razvoja ledvičnih zapletov in s tem izboljšala razumevanje patofiziologije Fabryjeve nefropatije.

**Ključne besede:** Fabryjeva nefropatija, mikroRNA

## IL-11

**Specifični humoralni in avtoimunski odziv na cepljenje proti covidu-19****Specific humoral and autoimmune response to COVID-19 vaccination**

Manca Ogrič<sup>1</sup>, Polona Žigon<sup>1,2</sup>, Tinka Švec<sup>1</sup>, Katja Lakota<sup>1,2</sup>, Snežna Sodin-Šemrl<sup>1,2</sup>, Žiga Rotar<sup>1,3</sup>, Saša Čučnik<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za revmatologijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Koper, Slovenija

<sup>3</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup>Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija

E-mail: manca.ogric@kclj.si

Pojav SARS-CoV-2 je vodil v hiter razvoj cepiv in raziskovanje njihove varnosti in učinkovitosti za preprečevanje covid-19 v realnem svetu je izrednega pomena. V raziskavi smo vrednotili specifični humoralni imunski in morebiten neželen avtoimunski odziv na cepljenje s cepivom mRNA BNT162b2 (Pfizer in BioNTech) pri zaposlenih v UKCL. Serume smo zbirali pred cepljenjem in po prvem (n=41), po drugem (pet odvzemov v 12 mesecih, n=288) ter po tretjem odmerku (n=156) cepiva. Določali smo koncentracije protiteles IgG proti beljakovini bodice (angl. *spike, S*) SARS-CoV-2 (protitelesa S) s SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (Euroimmun), avtoprotitelesa proti znotrajceličnim in topnim jedrnim antigenom ter antifosfolipidna protitelesa (n=58). Naivni preiskovanci so imeli po prvem odmerku značilno nižje koncentracije protiteles S (mediana 253 BAU/mL) kot prebolevniki (mediana 3648 BAU/mL). Po drugem odmerku so se koncentracije protiteles S zvišale le pri naivnih preiskovancih (mediana 3216 BAU/mL). Koncentracije protiteles S so bile v vseh časovnih točkah značilno višje pri prebolevnikih. Tretji odmerek je dodatno zvišal koncentracije protiteles S (mediana 4844 BAU/mL pri naivnih preiskovancih in 5845 BAU/mL pri prebolevnikih) na nivoje, ki so presegli nivoje po drugem odmerku. Avtoprotitelesa smo na novo odkrili pri 5/28 (18 %) predhodno negativnih naivnih preiskovancih in pri nobenemu predhodno negativnemu prebolevniku. Vseh pet preiskovancev je imelo nizke nivoje avtoprotiteles (dva avtoprotitelesa proti znotrajceličnim antigenom in trije antifosfolipidna protitelesa) in le pri dveh smo potrdili njihovo trajno prisotnost (antifosfolipidna protitelesa anti-β2GPI IgG). Naša raziskava je pokazala, da cepivo BNT162b2 inducira specifični humoralni imunski odziv proti SARS-CoV-2, ki se razlikuje med naivnimi preiskovanci in prebolevniki, medtem ko pomembnega avtoimunskega odziva nismo zasledili.

## IL-12

**Laboratorijska medicina: strokovno znanstvena revija Slovenskega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino za vse generacije strokovnjakov****Laboratory Medicine: professional scientific journal of the Slovenian Association for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine for all generations of experts**

Katarina Trebušak Podkrajšek

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Ljubljana, Slovenija

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

E-mail: katarina.trebusakpodkrajsek@mf.uni-lj.si

Laboratorijska medicina je revija, ki jo izdaja Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM). 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 širšega področja Laboratorijske medicine. Tako revija objavlja prispevke iz področja klinične biokemije, laboratorijske hematologije, kakovosti in akreditacije medicinskih laboratorijev, laboratorijske medicinske genetike, pacientu prilagojene laboratorijske medicine pa tudi laboratorijske patologije s citologijo, laboratorijske mikrobiologije in laboratorijske transfuzijske medicine. Laboratorijska medicina ima uredniško politiko, za kakovost prispevkov skrbimo glava urednica in področni uredniki. Vsi prispevki so recenzirani. Posamezen prispevek namreč pregledata dva neodvisna recenzenta, ki ocenita ali je primeren za objavo, ter lektor za slovenski ali angleški jezik.

Revija pokriva izredno dinamično in hitro razvijajoče se področje. Cilj revije je, da postane medij za poročanja razvojnih in raziskovalnih dosežkov za slovenske in tuje strokovnjake in raziskovalce. Tako bo revija omogočala hitro in enostavno seznanjanje z novostmi in bo služila kot most med razvojem in raziskavami ter strokovnjaki iz tega področja. Želimo, da Laboratorijska medicina postane uveljavljen način stalnega izobraževanja in izpopolnjevanja za vse, naj bodo to že uveljavljeni strokovnjaki, strokovnjaki na začetku svoje poti ali pa študenti.

## IL-13

**How to estimate kidney function in 2022**

Joris Delanghe

Ghent University, Department Clinical Chemistry, Ghent, Belgium

E-mail: Joris.Delanghe@UGent.be

In practice, GFR is estimated (eGFR) from endogenous marker concentrations. There remains a lack of accuracy for the current eGFR approaches. Clearances of exogenous markers are considered the most accurate way to evaluate kidney function (measured GFR, mGFR). As standardized protocols are lacking, the mGFR value may be biased. Inulin clearance has long been considered as the reference method to determine measured mGFR. Given the limitations of serum creatinine, and inulin, non-radioactive (iohexol, iohalamate) and radioactive exogenous mGFR markers are considered the most accurate options to evaluate GFR. mGFR procedures are complex and are associated with a degree of error. The limited <sup>51</sup>Cr-EDTA availability, lacking certified reference materials for iohexol, iohexol is an off-label IVD, and lacking uniform protocols lead to varying results and question the merits of mGFR methods as a golden standard to evaluate kidney function. Regulatory issues are narrowing the clinical use of mGFR. There is a call for standardization of mGFR.

The most accurate creatinine-based GFR-estimating equation (CKD-EPI 2009 equation) has its limitations. Its main limitation is the imprecision in estimating mGFR. Current creatinine-based equations have lower accuracy in ethnic groups other than whites and Afro-Americans. Serum cystatin C has been proposed as an alternative: it is less influenced by muscle mass than creatinine, a significantly higher accuracy is found for eGFR<sub>Cr-cys</sub> in comparison with eGFR<sub>cys</sub> and eGFR<sub>Cr</sub>. Cystatin C equations have been developed, which perform as well as the CKD-EPI 2012 equations. The combined equation is not independent of eGFR<sub>Cr</sub> and requires specification of ethnicity. The 2012 CKD-EPI eGFR<sub>cys</sub> equation can be used without specifying ethnicity but is not more accurate than the 2009 CKD-EPI eGFR<sub>Cr</sub> equation.

## IL-14

**Jadecare - integrirana oskrba na področju kronične ledvične bolezni****Jadecare - integrated care in the field of Chronic Kidney Diseases (CKD)**

Jelka Lindič<sup>1</sup>, Karmen Janša<sup>2</sup>, Martina Zorko Kodolja<sup>2</sup>, Miha Arnol<sup>1</sup>, Nena Kopčavar Guček<sup>3</sup>, Radovan Hojs<sup>4</sup>, Dimitrij Klančič<sup>5</sup>, Damjan Kovač<sup>1</sup>, Andrej Škoberne<sup>1</sup>, Nebojša Vasić<sup>6</sup>, Bojan Vujkovic<sup>7</sup>, Marjeta Zupet<sup>2</sup>, Maksimiljan Gorenjak<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za nefrologijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije, Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup>Zdravstveni dom Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup>Univerzitetni klinični center Maribor, Klinika za interno medicino, Maribor, Slovenija

<sup>5</sup>Splošna bolnišnica Dr. Franca Derganca Nova Gorica, Nova Gorica, Slovenija

<sup>6</sup>Zveza društev ledvičnih bolnikov Slovenije, Ljubljana, Slovenija

<sup>7</sup>Splošna bolnišnica Slovenj Gradec, Oddelek za interno medicino, Slovenj Gradec, Slovenija

<sup>8</sup>Univerzitetni klinični center Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Maribor, Slovenija

E-mail: karmen.jansa@zzzs.si

Kronična ledvična bolezen (KLB) postaja v Evropi in pri nas glavni zdravstveni in stroškovni problem, saj je povezana z veliko obolevnostjo, smrtnostjo in stroški zdravljenja. KLB ima že vsaka deseta odrasla oseba, saj je v veliki meri posledica najpogostejših bolezni sodobnega časa – zvišanega krvnega tlaka, sladkorne bolezni in srčno-žilnih bolezni. Glede na epidemiološke raziskave v Evropi predvidevamo, da ima KLB trenutno v Sloveniji 150.000 do 200.000 ljudi in da bo število bolnikov s KLB v prihodnje še naraščalo. V okviru EU projekta Jadecare v sodelovanju med Slovenskim nefrološkim društvom - SZD, Združenjem zdravnikov družinske medicine - SZD, Slovenskim združenjem za klinično kemijo in laboratorijsko medicino, Zvezo društev ledvičnih bolnikov Slovenije in Zavodom za zdravstveno zavarovanje Slovenije zato pripravljamo nov celovit pristop za obvladovanje KLB. Cilji našega sodelovanja so: implementirati optimalne presejalne preiskave za zgodnje odkrivanje KLB pri skupinah z večjim tveganjem, optimizirati prehajanje pacientov s KLB med primarnim, sekundarnim in terciarnim nivojem, izboljšati in poenostaviti komunikacijske poti, preučiti možnosti in vzpostaviti ustrezno informacijsko podporo za prenos podatkov iz primarnega na specialistični nivo, vključiti edukacijo o KLB v preventivne programe otrok in odraslih s ciljem ohranjanja zdravega načina življenja ter uvesti edukacijo o KLB in želenih ciljih zdravljenja za doseganje največjega sodelovanja bolnika ves čas trajanja bolezni na vseh nivojih obravnave. S spremembo pristopa k obvladovanju KLB je povezana tudi posodobitev dosedanjega obračunskega sistema in racionalna poraba sredstev. Končni cilji so izboljšanje zdravja populacije, opolnomočenje bolnikov s KLB, podaljšanje kakovostnega življenja, njihove delazmožnosti in socialne vključenosti.

## IL-15

**Referenčna metoda za določanje hitrosti glomerulne filtracije****Reference method for determination of glomerular filtration rate**

Janez Klavž

UKC Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Maribor, Slovenija

E-mail: jani.klavz@ukc-mb.si

Zanesljiva in natančna določitev hitrosti glomerulne filtracije (angl. *glomerular filtration rate*, *GFR*) je v klinični praksi ter epidemioloških in kliničnih raziskavah izjemnega pomena (1). Merjenje očistka inulina je v preteklosti veljalo za zlati standard določanja GFR, vendar je ta metoda nepraktična za uvedbo v



rutino in povezana z visokimi stroški. V ospredje tako stopajo druge metode, kjer merimo očistek s pomočjo kontrastnih označevalcev. Iohexol je neionsko jodirano kontrastno sredstvo, ki se najpogosteje uporablja kot alternativa inulinu pri določanju GFR. Njegove prednosti so nizka cena, enkratna aplikacija majhne količine ter s tem povezana majhna toksičnost (2). V UKC Maribor smo v sodelovanju z Inštitutom Mario Negri v Bergamu (Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS) uspešno uvedli protokol za določanje GFR z uporabo očistka iohexola. Analiza vzorcev po aplikaciji poteka s pomočjo visokoločljivostne tekočinske kromatografije (angl. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*). Določanje vsebnosti iohexola v biološkem materialu je relativno enostavno, metoda ima visoko občutljivost in specifičnost ter nizko medlaboratorijsko variabilnost. Priprava vzorcev za analizo je hitra, označevalec pa ima tudi dolgočasno stabilnost v bioloških vzorcih (3). Glede na navedene lastnosti je iohexol najboljši kandidat za globalno implementacijo standardiziranega protokola za določanje GFR v klinični praksi, prednost njegove uporabe pa je tudi možnost sodelovanja v programu zunanje ocene kakovosti.

**Gljučne besede:** glomerulna filtracija, iohexol, ocena ledvične funkcije

1. Delanaye P, Melsom T, Ebert N, Bäck SE, Mariat C, Cavalier E, et al. Iohexol plasma clearance for measuring glomerular filtration rate in clinical practice and research: a review. Part 2: Why to measure glomerular filtration rate with iohexol? *Clin Kidney J.* 2016 Oct;9(5):700-4.
2. Delanaye P, Ebert N, Melsom T, Gaspari F, Mariat C, Cavalier E, et al. Iohexol plasma clearance for measuring glomerular filtration rate in clinical practice and research: a review. Part 1: How to measure glomerular filtration rate with iohexol? *Clin Kidney J.* 2016 Oct;9(5):682-99.
3. Carrara F, Gaspari F. GFR measured by iohexol: the best choice from a laboratory perspective. *J Lab Precis Med.* 2018;3:77.

#### IL-16

### Terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil z uporabo pametne tehnologije

#### *Therapeutic drug monitoring with the use of smart technology*

Mateja Stopinšek<sup>1</sup>, Polonca Drogenik<sup>1</sup>, Sebastjan Bevc<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Univerzitetni klinični center Maribor, Centralna lekarna, Maribor, Slovenija

<sup>2</sup>Univerzitetni klinični center Maribor, Oddelek za nefrologijo, Maribor, Slovenija

E-mail: mateja.stopinsek@ukc-mb.si

Sodobna medicina namenja velik poudarek posamezniku prilagojenemu zdravljenju, eden od pristopov je tudi terapevtsko spremljanje koncentracij (TDM). TDM omogoča individualno odmerjanje zdravila za bolnika, najpogosteje za učinkovine z ozkim terapevtskim oknom. Gre za multidisciplinarno dejavnost, ki zahteva

sodelovanje vseh vpletenih strokovnjakov: zdravnika, medicinske sestre, specialista medicinske biokemije in kliničnega farmacevta. V Univerzitetnem kliničnem centru Maribor smo do sedaj v klinično prakso uvedli TDM za šest učinkovin z ozkim terapevtskim oknom: vankomicin, gentamicin, amikacin, metildigoksin, valprojsko kislino in ciklosporin. V nefrologiji predstavlja ciklosporin eno temeljnih imunosupresivnih zdravil. Gre za kronično terapijo, ki jo bolniki prejemajo v domačem okolju, zato se v klinični praksi srečujemo z vprašanjem ustrezne sodelovalnosti bolnikov. Za kakovostno izvedbo storitve TDM potrebujemo namreč zanesljive podatke o bolnikovi zgodovini jemanja zdravila. Pri tem nam je v pomoč uporaba pametnih tehnologij, ki beležijo bolnikovo jemanje izbranega zdravila. Tako pridobimo zanesljive podatke o bolnikovi sodelovalnosti ter točnih urah jemanja zdravila, kar je za kvalitetno izvedbo TDM ključno. V Univerzitetnem kliničnem centru Maribor smo zato zasnovali raziskavo, v kateri smo utečeno storitev TDM ciklosporina nadgradili z uporabo pametne tehnologije MEMS Clap (Medication Event Monitoring System). Gre za vsebnike s pametnimi pokrovčki, ki zabeležijo vsako odpiranje. Ob rednih kontrolah v ambulanti Oddelka za nefrologijo bolniki oddajo kri za določitev koncentracije ciklosporina, medtem pa s pokrovčkov pametnih vsebnikov odčitamo informacije o bolnikovi sodelovalnosti ter urah jemanja zdravila. Te podatke, skupaj s koncentracijo ciklosporina v krvi in uporabo farmakokinetičnega programa DoseMe, uporabimo za načrtovanje odmernega režima v prihodnje in tako optimiziramo zdravljenje s ciklosporinom.

#### IL-17

### Thyroid function tests: clinical value, assay evolution and common pitfalls

Damien Gruson

*Cliniques Universitaires Saint-Luc, Department of Laboratory Medicine, Brussels, Belgium*

E-mail: damien.gruson@saintluc.uclouvain.be

Thyroid diseases are frequent conditions with possibly crushing health outcomes that influence all populations around the world and thyroid function tests (TFT) are frequently ordered for their diagnosis and monitoring. TFT, including thyroid stimulating hormone (TSH, or thyrotropin), thyroxine (T<sub>4</sub>), and triiodothyronine (T<sub>3</sub>) tests, are used in the initial evaluation and monitoring of thyroid disease. The value of TFT is also recognized for thyroid cancer management with the examples of thyroglobulin and calcitonin. Assay performances and appropriate test ordering are important points of focus to ensure best use of TFT. Confounding factors and common interferences such as macro-TSH, biotin, antistreptavidin antibodies, anti-ruthenium antibodies, thyroid hormone autoantibodies, and heterophilic antibodies will also be reviewed.

## IL-18

**TSH Reference Values in elderly population (controversial)****Santiago Fares-Taie***Laboratorio Fares Taie, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina**E-mail: sfarestaie@hotmail.com*

Thyrotropin (TSH) exhibits normal biological variations throughout life. Although this is known by specialists, laboratories in Argentina do not publish specific reference values for older adults in their reports. This leads to a post- and post-post-analytical error misdiagnosing thyroid pathology in normal patients by non-specialist. The use of age specific TSH reference values decreases misclassification of patients with thyroid dysfunction and subsequent overtreatment.

The validation of age-specific reference values requires TSH measurements in the different age groups of the normal population (free of medication, free of pathology, no consumption of alcohol and tobacco, negative antithyroid antibodies and free of thyroid nodules). Due to the difficulty in obtaining normal patients in adulthood, we perform a statistical approximation to verify the reference values from the literature, using TSH results from the outpatient population of the city of Mar del Plata, Argentina.

## IL-19

**Vpliv fizioloških dejavnikov na rezultate laboratorijskih preiskav ščitnice****Influence of Physiological Parameters on Results of Thyroid Laboratory Tests****Blaž Krhin***UKC Ljubljana, Klinika za nuklearno medicino, Ljubljana, Slovenija**E-mail: blaz.krhin@kclj.si*

Razvoj laboratorijskih preiskav ščitnice (LPŠ) je prinesel hitrejšje, specifičnejše ter občutljivejše metode, ki omogočajo bolj celostno laboratorijsko diagnostiko bolezni ščitnice. Sodobne metode med drugim omogočajo tudi preučevanje številnih predanalitskih dejavnikov, vključno s fiziološkimi, ki lahko posredno ali neposredno vplivajo na rezultate LPŠ. Izkazalo se je, da so nekatera uporabljena referenčna območja LPŠ relativno široka (preširoka?), saj vključujejo tudi različna fiziološka stanja.

Znano je, da ima tirotropin (TSH) svoj značilen dnevni ritem z bolj ali manj izrazitim nihanjem, na katerega lahko vplivata tudi odtegnitev spanca in uživanje alkohola. Zaradi dnevnega ritma in še nekaterih drugih dejavnikov so inter-individualna nihanja TSH relativno velika, intra-individualna pa majhna. Ker je večina referenčnih območij postavljenih za večje skupine, so izmerjene vrednosti TSH nekaterih posameznikov lahko lažno znotraj referenčnega območja. Interpretacija rezultatov LPŠ glede na starost

preiskovanca ni zanemarljiva, saj imajo novorojenčki kmalu po rojstvu značilna nihanja TSH in prostih ščitničnih hormonov, otroci in mladostniki pa v primerjavi z odraslo populacijo značilno višje vrednosti pT3. Rezultati raziskav o vplivu starosti na TSH niso enoznačni, večina pa jih potrjuje, da lahko v višjih starostnih skupinah pričakujemo zmerno višje vrednosti TSH. Ustrezna interpretacija rezultatov LPŠ v nosečnosti predstavlja poseben izziv. Ob naraščanju in nato upadanju vrednosti humanega horijevega gonadotropina (hCG) se vrednosti TSH med nosečnostjo zrcalno spreminjajo, čemur sledijo tudi vrednosti celokupnih in prostih ščitničnih hormonov, ki so poleg že omenjenega vpliva podvržene še drugim endogenim in eksogenim dejavnikom. Uporaba referenčnih območij, specifičnih za posamezni trimeser nosečnosti, pa lahko interpretacijo izmerjenih rezultatov bistveno olajša. Rezultati novejših raziskav kažejo, da indeks telesne mase pozitivno korelira s TSH, kar nakazuje potrebo po uvedbi referenčnih območij za TSH, ki bi upoštevala tudi indeks telesne mase. Vplivi mraza, posta, stresa ter dolge in intenzivne fizične aktivnosti na delovanje ščitnice so manj raziskani. Rezultati obstoječih raziskav kažejo, da lahko v takih stanjih telo preide v stanje »varčevanja z energijo«, kar običajno zniža vrednosti prostega trijodtironina. O morebitnem vplivu navedenih dejavnikov na vrednosti TSH pa rezultati raziskav niso tako enotni.

Glede na opisano lahko zaključimo, da interpretacijo rezultatov LPŠ bistveno olajša uvedba in uporaba referenčnih območij, ki upoštevajo različna fiziološka stanja in druge dejavnike.

## IL-20

**Vloga laboratorijskega diagnosticiranja pri celostni obravnavi tirološkega bolnika****Impact of Laboratory Diagnostics on Clinical Management of Patients with Thyroid Disease****Katja Zaletel***Klinika za nuklearno medicino, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija**E-mail: katja.zaletel@kclj.si*

Ščitnične bolezni so pogoste in imajo večinoma kroničen potek. Ocenjujejo, da je prevalenca avtoimunskih bolezni ščitnice 18 %, ščitnične noduse pa z ultrazvokom odkrijejo pri skoraj 50 % odrasle populacije. Pojavne oblike ščitničnih bolezni so raznolike, s pojavom različnih ščitničnih bolezni pri posamezniku pa ni redko. Ščitnične bolezni se lahko odražajo z motnjami delovanja in z morfološki spremembami v parenhimu žleze. Za opredelitev ščitničnih bolezni ter odločitev o obravnavi bolnika je potreben celosten pristop, ki temelji na klinični oceni, laboratorijskem diagnosticiranju ter ultrazvočni oceni morfološke ščitnice, pri izbranih bolnikih pa sta za opredelitev potrebni še scintigrafija in tankoigelnna biopsija ščitnice. Laboratorijsko diagnosticiranje vključuje meritve koncentracij tirotropina (TSH), prostega tiroksi-



na (pT4), prostega trijodtironina (pT3), protiteles proti ščitnični peroksidazi, protiteles proti tiroglobulinu, protiteles proti receptorju za TSH, tiroglobulina in kalcitonina. Meritev koncentracije naštetih analitov omogočajo različne metode, ki imajo različno točnost in natančnost, različne referenčne vrednosti ter različno občutljivost na moteče dejavnike. Zato rezultati meritev koncentracije istega analita z uporabo različnih metod niso primerljivi, uporabo različnih metod pri sledenju bolnikov pa odsvetujejo. Poleg izbrane metode na rezultate laboratorijskih meritev vplivajo tudi številni dejavniki bolnika in vzorca. Za dnevni ritem TSH je značilno, da najnižjo in najbolj stabilno vrednost doseže med 10. in 16. uro. V tem času je priporočen tudi odvzem vzorca krvi, saj je ob zgodnejšem odvzemu koncentracija TSH lahko zvišana. S starostjo bolnika narašča razmerje med pT4 in pT3, na razmerje med prostima hormona pa značilno vplivajo tudi ščitnične bolezni.

V nosečnosti je v prvem trimesečju pogosto znižana koncentracija TSH, v tretjem trimesečju pa koncentracija pT4 (5). Pri interpretaciji rezultatov laboratorijskih meritev moramo upoštevati še učinke številnih zdravil, ki vplivajo na sintezo, metabolizem ali transport ščitničnih hormonov, pa tudi na imunski odziv. Neustrezna koncentracija TSH in prostih hormonov je pogosto odraz motnje delovanja ščitnice, ki zahteva naporitev k tirologu. Za razliko od laboratorijskih meritev TSH in prostih hormonov, ki morajo biti dostopne bolnikom na vseh ravneh zdravstvenega varstva, pa rezultati meritev koncentracij specifičnih ščitničnih protiteles, tiroglobulina in kalcitonina brez celostne tirološke ocene ne vplivajo na odločitev o nadaljnji obravnavi bolnika. Zato naj te preiskave indicira specialist v sklopu celostne obravnave bolnika.

## POVZETKI POSTROV

P-1

### Regulativa preiskovanja bioloških vzorcev za covid-19 v Sloveniji

#### Regulatory framework for the testing of biological samples for covid-19 in Slovenia

Karmen Jerebic, Borut Božič

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija

E-mail: karmen.jerebic26@gmail.com

Hitro naraščanje okužb s SARS CoV-2 v začetku leta 2020 ni predstavljalo problema le zdravstveni stroki, ampak tudi pravni. Namen raziskave je sistematični pregled spreminjanja regulative preiskovanja bioloških vzorcev za Covid-19 v Republiki Sloveniji. Vir podatkov so bile spletne strani Uradnega lista RS, Ministrstva za zdravje, Nacionalnega inštituta za javno zdravje in Pravno-informacijski sistem RS. Pravne podlage za izvajanje testiranj na prisotnost SARS-CoV-2 so bile v Zakonu o zdravstveni dejavnosti (ZZDej), Zakonu o nalezljivih boleznih in Pravilniku o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine. V dveh letih je bilo sprejetih preko 200 pravnih aktov na temo covid-19, med drugim tudi Uredba o izvajanju presejalnih programov za zgodnje odkrivanje okužb z virusom SARS-CoV-2 in Pravilnik o izvajanju mikrobioloških preiskav na virus SARS-CoV-2. Sprejete so bile 3 spremembe Pravilnika in 5 sprememb ZZDej. Regulativa se je spreminjala v skladu s potrebami obvladovanja epidemiološke situacije. Preiskave kategoriziramo v tri skupine: potrditvene preiskave na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR), hitre antigenske teste (HAGT) in analizni kompleti za samotestiranje. Na podlagi spremenjene zakonodaje so dovoljenje za izvajanje testov PCR dobili tudi javni zavodi z dovoljenjem za področje medicinske biokemije, za HAGT pa izvajalci v javni zdravstveni mreži, ki prej niso imeli dovoljenja

za delo na področju laboratorijske medicine. Težave, ki se pojavijo pri taki organizaciji laboratorijskega dela so zagotavljanje kakovosti testiranja, ravnanja z biološkimi vzorci in pravilnosti odčitane rezultata. Tako so pravne nejasnosti ali nedorečenosti vplivale tudi na zanesljivost testiranja in posledično obvladovanje epidemije.

P-2

### Spremembe v številu kopij izbranih genov pri slovenskih otrocih z B-celično akutno limfoblastno levkemijo

#### Copy number variations of selected genes in Slovene children with B-cell acute lymphoblastic leukemia

Klementina Črepinšek<sup>1,2</sup>, Gašper Marinšek<sup>1</sup>, Marko Kavčič<sup>2,3</sup>, Tomaž Prelog<sup>3</sup>, Lidija Kitanovski<sup>3</sup>, Janez Jazbec<sup>2,3</sup>, Maruša Debeljak<sup>2,3</sup>

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

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični oddelek za otroško hematologijo in onkologijo, Ljubljana, Slovenija

E-mail: klementina.crepinsek@kclj.si

Delecije gena IKZF1 so zelo pomemben prognostični dejavnik pri pediatrični B-celični akutni limfoblastni levkemiji, zlasti ob prisotnosti drugih sočasnih delecij pri izbranih genih, povezanih z diferenciacijo celic B in uravnavanjem celičnega cikla (profil IKZF1plus) (2). Namen naše študije je bil ugotoviti pogostost delecij IKZF1 in delecij drugih izbranih genov ter njihov prognostičen pomen pri slovenskih otrocih z B-ALL. Preučevali smo kohorto

99 bolnikov z diagnozo B-ALL med letoma 2012 in 2020, zdravljenih po protokolu ALL IC-BFM 2009. Z uporabo metode od ligacije odvisno hkratno pomnoževanje sond smo za prisotnost sprememb v številu kopij genov (CNV) analizirali 88 vzorcev kostnega mozga ali periferne krvi. Vsaj en CNV je bil odkrit pri več kot 65 % analiziranih vzorcev. Najpogosteje spremenjeni geni so bili PAX5 in CDKN2A/B. Delecije v IKZF1 so bile prisotne pri 18,2 % analiziranih vzorcev in so bile povezane s slabšim 5-letnim preživetjem brez dogodka (EFS). Profil IKZF1plus smo našli pri 12,5 % analiziranih vzorcev. Ti bolniki so imeli slabši 5-letni EFS kot tisti z delecijami samo v genu IKZF1 in tisti brez delecij. Tudi celokupno preživetje je bilo slabše pri bolnikih s profilom IKZF1plus v primerjavi s tistimi, ki so imeli prisotne delecije samo v IKZF1, in tistimi brez delecij, vendar pa razlike med skupinami niso bile statistično pomembne (3). Naši rezultati potrjujejo pomembnost določanja CNV pri otrocih z B-ALL. Določanje teh CNV ob postavitvi diagnoze daje dodatne podatke za razvrščanje bolnikov v različne skupine tveganja in prilagoditev zdravljenja.

**Ključne besede:** spremembe v številu kopij genov (CNV), delecije IKZF1, B-celična akutna limfoblastna levkemija

1. Stanulla M, Dagdan E, Zaliova M, Möricke A, 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.
2. Crepinsek K, Marinsek G, Kavcic M, Prelog T, Kitanovski L, Jazbec J, et al. Clinical impacts of copy number variations in B-cell differentiation and cell cycle control genes in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: a single centre experience. *Radiol Oncol* [Internet]. 2021 Dec 22; Available from: <https://www.sciendo.com/article/10.2478/raon-2021-0050>

### P-3

## Vpliv urejenosti sladkorne bolezni tipa 1 na metilacijo DNA

### Impact of different levels of glycemic control in type 1 diabetes on DNA methylation

Barbara Čugalj Kern<sup>1,2</sup>, Jernej Kováč<sup>2,3</sup>, Robert Šket<sup>3</sup>, Barbara Jenko Bizjan<sup>2,3</sup>, Tine Tesovnik<sup>3</sup>, Tadej Battelino<sup>1,2</sup>, Nataša Bratina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični oddelek za specializirano laboratorijsko diagnostiko, Ljubljana, Slovenija

E-mail: barbara.kern@kclj.si

Urejenost sladkorne bolezni tipa 1 (SB1) je zelo pomembna, saj dolgotrajna hiperglikemija vodi v mikro- in makrovaskularne zaplete (1). Dolgotrajna hiperglikemija vpliva na metilacijo DNA. Spremembe v metilaciji DNA so povezali z diabetično retinopatijo in diabetično

nefropatijo (2). Namen raziskave je ugotoviti vpliv urejenosti SB1 na metilacijo DNA pri otrocih s SB1 brez znakov poznih zapletov.

Spremembe v metilaciji DNA smo določali na izolirani DNA iz krvnih vzorcev otrok s SB1 z različno urejeno SB1. Urejenost SB1 smo ocenili na podlagi povprečnih vrednosti glikiranega hemoglobina (HbA1c) in glukoze variabilnosti (GV). Glede na njihove vrednosti smo otroke razdelili v skupine, ki jih smo nato primerjali (HbA1c < 7% proti HbA1c > 8% in GV < 40% proti GV > 50%). Spremembe v metilaciji DNA smo določali z metodo imunoprecipitacije metilirane DNA in sekvenciranjem naslednje generacije.

Določili smo spremembe v metilaciji DNA pri 14 regijah med skupinama otrok z HbA1c < 7% in HbA1c > 8%. 11 regij, povezanih z geni DPP6, STK4, TAF4B, PIGK, LSAMP, FAT1, KDM4B, LINC02397, miR-6724-1 and RNA5-8SN4, so bile bolj metilirane v skupini otrok z HbA1c < 7%, medtem ko so bile regije, povezane z geni GSTA4, CLDN10 and TENM4, bolj metilirane v skupini otrok z HbA1c > 8%. Med skupinama otrok z GV < 40% in GV > 50% smo določili 4 različno metilirane regije. Regiji povezani z genoma FAM27E3 in miR-4265 sta bili bolj metilirani v skupini otrok z GV < 40%, medtem ko sta bili regiji povezani z genoma RPH3AL in FCGR2A bolj metilirani v skupini otrok z GV > 50%.

**Ključne besede:** sladkorna bolezen tipa 1, metilacija DNA, pozni zapleti

1. Piona C, Ventrici C, Marcovecchio L, Chiarelli F, Maffei C, Bonfanti R, et al. Long-term complications of type 1 diabetes: what do we know and what do we need to understand? *Minerva Pediatr* [Internet]. 2022 Jan;73(6):504–22. Available from: <https://www.minervamedica.it/index2.php?show=R15Y2021N06A0504>
2. Chen Z, Miao F, Braffett BH, Lachin JM, Zhang L, Wu X, et al. DNA methylation mediates development of HbA1c-associated complications in type 1 diabetes. *Nat Metab* [Internet]. 2020 Aug 20;2(8):744–62. Available from: <http://www.nature.com/articles/s42255-020-0231-8>

### P-4

## Primerjava testnih trakov in refraktometra za določitev relativne gostote v urinu

### Urine specific gravity measurement: comparison of reagent strips and refractometer

Aljaž Pirnat<sup>1</sup>, Luka Turnšek<sup>1</sup>, Timotej Puconja<sup>2</sup>, Alenka Trampus Bakija<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UKC Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>ZVD Zavod za varstvo pri delu d.o.o., Center medicine dela, prometa in športa, Laboratorij za klinično kemijo in hematologijo, Ljubljana, Slovenija

E-mail: aljaz.pirnat@kclj.si

Relativna gostota (SG) urina je razmerje med težo urina in težo enake volumnske enote demineralizirane vode. Preiskava omogoča oceno hidriranosti osebe in koncentracijske sposobnosti ledvic.

Najbolj točna in natančna metoda za določanje SG urina je refraktometrija, ki deluje na principu določitve loma svetlobe. Pogostejše je semikvantitativno določanje SG s testnim trakom, kjer testno polje vsebuje ionski izmenjevalec in pH indikator. V laboratorijih Kliničnega inštituta za specialno laboratorijsko diagnostiko in Zavoda za varstvo pri delu smo v 115 vzorcih drugega jutranjega urina izmerili SG z ročnim refraktometrom (HRM1 18 A.T.C., Kruss, Nemčija) in testnima trakoma dveh proizvajalcev (Combur 10-Test M, Roche, Švica in Multistix 10 SG Urine Test Strips, Siemens Healthineers, Nemčija). Z izračunom Spearmanovega koeficienta smo ovrednotili korelacijo testnega traku z ročnim refraktometrom in z Bland-Altmanovo analizo ocenili ujemanje metod. Oba testna trakova sta izkazala visoko in statistično značilno korelacijo meritev z refraktometrom (Combur 10-Test M:  $\rho=0,758$ ,  $P<0,0001$ ; Multistix 10 SG Urine Test Strips:  $\rho=0,809$ ,  $P<0,0001$ ). Bland-Altmanova analiza je pokazala, da je pri testnem traku Combur 10-Test M prisoten bias (povprečje razlik =  $-0,0002$ , 95% CI [ $-0,0011$ ,  $0,0008$ ]), ki ni statistično značilen. Nasprotno je pri testnem traku Multistix 10 SG Urine Test Strips prisoten statistično značilen bias (povprečje razlik =  $-0,0059$ , 95% CI [ $-0,0068$ ,  $-0,0050$ ]). Zaključimo lahko, da testni trak proizvajalca Roche izkazuje ustrezno korelacijo in primerljivost z refraktometrom. Testni trak proizvajalca Siemens Healthineers izkazuje visoko korelacijo, vendar je primerljivost z refraktometrom manj ustrezna. V primeru potrebe po natančni določitvi SG (npr. koncentracijski preizkus) je primernejša določitev z refraktometrom.

**Ključne besede:** relativna gostota

## P-5

### Primer nealkoholnega steatohepatitisa pri pediatričnem pacientu z družinsko hipobetalipoproteinemijo kot posledica novo odkrite spremembe v genu APOB

#### *Nonalcoholic steatohepatitis in a pediatric patient with familial hypobetalipoproteinemia due to a novel APOB mutation*

Neža Molk, Mojca Bitenc, Darja Urlep, Sara Bertok, Urša Šuštar, Katarina Trebušak Podkrajšek, Mojca Žerjav Tanšek, Tadej Battelino, Maruša Debeljak, Urh Grošelj

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

E-mail: neza.molk@gmail.com

Hipobetalipoproteinemija (FHBL, angl. familial hypobetalipoproteinemia) je ena izmed dednih oblik hipoholesterolemij, ki se deduje avtosomno ko-dominantno. Vzrok zanjo so pogosto spremembe v genu APOB, ki lahko vodijo v nastanek krajših oblik proteina (1). Zanje je značilno počasnejše izločanje iz jeter in hitrejše odstranjevanje iz krvne plazme. Klinični znaki FHBL obsegajo malab-

sorbicijo, nealkoholno zamaščenost jeter, nevrološke, endokrine in hematološke disfunkcije ter nizke vrednosti lipidotopnih vitaminov (2). Predstavljen bo primer mladega odraslega z diagnosticirano FHBL. Na Kliničnem oddelku za endokrinologijo in presnove bolezni Pediatrične klinike je bil prvič obravnavan pri desetih letih, kjer so mu v okviru preiskav jetrne steatoze diagnosticirali FHBL. Izmerjeni vrednosti lipoproteina majhne gostote  $0,6\text{mmol/L}$  ( $2-3,5\text{mmol/L}$ ) in APOB  $0,2\text{mmol/L}$  ( $0,55-1,40\text{mmol/L}$ ) sta bili pod referenčnimi vrednostmi, povišane pa so bile vrednosti jetrnih encimov alanin aminotrasferaze  $1,68\ \mu\text{kat/L}$  ( $<0,48\ \mu\text{kat/L}$ ) in aspartat aminotrasferaze  $0,9\ \mu\text{kat/L}$  ( $<0,61\ \mu\text{kat/L}$ ). Jetra so bila povečana in rahlo maščobno infiltrirana, medtem ko magnetna resonanca glave ni pokazala patoloških sprememb. Preiskovanec je imel dva zloma kolka, ki sta bila posledica osteopenije. Na podlagi genetskih preiskav smo potrdili heterozigotno spremembo v genu APOB c.6624dupA (NM\_000384.3), ki povzroči spremembo bralnega okvirja in privede do zgodnje prekinitve prevajanja v protein p.Leu2209IlefsTer5 (NP\_000375.2). Slednja v literaturi še ni bila opisana. Spremembo smo potrdili tudi pri materi preiskovanca, ki ima prav tako nizke vrednosti lipoproteina majhne gostote in nealkoholno zamaščena jetra. Uvedli smo terapijo, ki vključuje omejevanje maščob v prehrani in dodajanje lipidotopnih vitaminov E, A, K in D ter kalcijevega karbonata. V našem primeru smo odkrito spremembo prvi povezali z diagnozo FHBL.

**Ključne besede:** hipobetalipoproteinemija, APOB

1. Moutzouri E, Elisaf M, N. Liberopoulos E. Hypcholesterolemia. Current Vascular Pharmacology. 2011;9(2):200-212.

2. Di Costanzo A, Di Leo E, Noto D, Cefalù A, Minicocci I, Polito L et al. Clinical and biochemical characteristics of individuals with low cholesterol syndromes: A comparison between familial hypobetalipoproteinemia and familial combined hypolipidemia. Journal of Clinical Lipidology. 2017;11(5):1234-1242.

P-6

### Univants 2021 - measurable better health care performance: Renal Osteodystrophy Monitoring by Monthly PTH Determination in Hemodialysis CKD-MBD Patients

Sanda Jelisavac Čosić<sup>1</sup>, Draško Pavlović<sup>2</sup>, Boris Kudumija<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia

<sup>2</sup>Avitum Polyclinic, Zagreb, Croatia

E-mail: sanda.jelisavac-cosic@kbc-zagreb.hr

Mitigating bone loss and maximizing patient wellness with monthly monitoring and potentially accelerated surgical intervention for patients on dialysis Chronic kidney disease–mineral bone disorder (CKD-MBD) is a major cause of excess morbidity and mortality in haemodialysis patients. Global clinical practice guidelines recommended by KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) endorse routine monitoring of bone biomarkers including alkaline phosphatase and parathyroid hormone (PTH) every 3-6 months in patients undergoing haemodialysis. In patients receiving treatment for CKD-MBD, or in patients with chronic kidney disease (CKD) and biochemical abnormalities, more frequent monitoring can enable enhanced identification of biomarker trends, early assessment of treatment efficacy and mitigation of associated side effects. Our integrated clinical care team follows this best practice of more frequent testing of bone biomarker levels, which are monitored every 4-5 weeks in patients on calcimimetics (CINET) and vitamin D (or vitamin D analogues; ZEMPLAR). In addition, monthly PTH monitoring occurs in all children on dialysis with CKD-MBD. Using this approach, better titration of drug dosing is possible, preserving bone density and avoiding potential side effects for our patients. With accelerated intervention in over 60% of patients undergoing monthly PTH monitoring, our program enhances patient wellness, mitigates long-term risk, and reduces overall healthcare costs.

P-7

### Pomen določanja kalcitonina pri medularnem raku ščitnice Importance of calcitonin determination in medullary thyroid cancer

Maruša Zupančič, Barbara Možina

Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

E-mail: marzupancic@onko-i.si

Kalcitonin je peptidni hormon, ki ga izločajo parafolikularne C celice ščitnice. Sodeluje pri hormonski regulaciji kalcija, vendar pa njegova klinična vloga še vedno ni dobro poznana. V laboratorijski medicini predstavlja določanje serumske koncentracije kalcitonina pomemben tumorski označevalec medularnega raka

ščitnice in hiperplazije C celic. V pomoč nam je pri postavitvi diagnoze, spremljanju zdravljenja, opredelitvi zasevkov ter pri prepoznavi ponovitve bolezni. Na Onkološkem inštitutu Ljubljana mesečno izvedemo približno 30 preiskav kalcitonina. Določamo ga na analizatorju Roche Cobas 8000 z elektrokemiluminiscenčno imunsko metodo (ECLIA). Preiskava mora biti zaradi nestabilnosti analita na sobni temperaturi izvedena v 4 urah ali pa je potrebno vzorec do analize zamrzniti. Orientacijske referenčne vrednosti povzete po proizvajalcu znašajo od 5,17 do 9,82 ng/L za ženske ter od 8,31 do 14,3 ng/L za moške, pri bolnikih z medularnim rakom ščitnice pa so vrednosti kalcitonina močno zvišane in lahko presegajo 20000 ng/L. Bolnikom se svetuje popolno tiroidektomijo ter v primeru zasevkov tudi disekcijo centralnega vratnega področja. Če so vrednosti kalcitonina pri bolniku po tiroidektomiji pod mejo detekcije, to nakazuje, da je bolnik v popolni remisiji ter ima nizko tveganje za ponovitev bolezni. Bolniki po tiroidektomiji z zvišanimi vrednostmi kalcitonina imajo najverjetneje oddaljene zasevke, posledično imajo slabšo prognozo ter potrebujejo dodatno sistemsko zdravljenje. Prognozično pomemben je tudi časovni okvir, v katerem pride do podvojitve vrednosti kalcitonina in CEA. Medularni rak ščitnice velja za agresivni rak, ki zgodaj zaseva, zato so zgodnja postavitve diagnoze ter hitro in uspešno zdravljenje ključni za preživetje bolnika.

**Ključne besede:** kalcitonin, tumorski označevalec, medularni rak ščitnice

1 Strojan P, Hočevar M. Onkologija učbenik za študente medicine [Internet]. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; 2018. p.103–106, 489–507. Dostopno: [www.onko-i.si/ucbenik\\_onkologija](http://www.onko-i.si/ucbenik_onkologija)

2 Viola D, Elisei R. Management of Medullary Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2019;48(1):285–301.

3 Kim M, Kim BH. Current Guidelines for Management of Medullary Thyroid Carcinoma. *Endocrinol Metab.* 2021;36(3):514–524.

P-8

### Ocena zmerne fibroze jeter z ELF testom The assessment of moderate liver fibroses with ELF test

Drago Arzenšek<sup>1</sup>, Lenka Gašperlin<sup>2</sup>, Ivica Avberšek-Lužnik<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Siemens Healthcare d.o.o., Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>SB Jesenice, Jesenice, Slovenija

<sup>3</sup>Fakulteta za zdravstvo Angele Boškin, Jesenice, Slovenija

E-mail: drago.arzensek@siemens-healthineers.com

Prekomerno kopičenje maščobe v jetrih lahko sproži razvoj fibroze jeter, ki pri nekaterih pacientih napreduje v cirozo. ELF test spada med novejša teste za oceno fibroze jeter in temelji na merjenju direktnih biomarkerjev jeternega tkiva kot so hialuronska kislina, amino-terminalni propeptid prokolagena tipa III in metaloproteinaza-1. Pri skupini preiskovancev smo z diagnostičnimi testi kot so ELF, APRI in FIB-4 skušali ugotoviti, če ti testi dajejo pri-



merljive ocene za zmerno stopnjo fibroze jeter glede na vrednosti v klinično uveljavljenih lestvicah (1). Za zmerno stopnjo fibroze so opredeljene vrednosti v lestvicah za ELF test: 7,7 -9,0, za APRI 0,7 -1,0 in za FIB-4 1,3 - 3,25.

V raziskavi je sodelovalo 40 preiskovancev (26 moških, 14 žensk) povprečne starosti  $47 \pm 10$  let. V vzorcih krvi smo izvedli meritve trombocitov (Tr) na ADVIA 2120 Siemens analizatorju, meritve aspartat-aminotransferaze (AST), alanin-aminotransferaze (ALT) in gama-glutamilne transferaze (GGT) pa na analizatorju Dimension EXL 200 ter ELF test na ADVIA Centaur po navodilih proizvajalca Siemens. Vrednosti ELF, APRI in FIB-4 smo izračunali po algoritmih v preglednem članku strokovne revije Gastroenterolog (1). Statistično analizo smo izvedli z SPSS 21.0

Rezultati so izraženi z mediano (min-max) in znašajo: Tr  $224 (123-359) \times 10^9/L$ ; AST  $0,37 (0,20-0,57)$ ; ALT  $0,54 (0,23-1,13)$ ; GGT  $0,36 (0,13-1,16)$  ukat/L, ELF  $8,49 (6,66-10,94)$ ; APRI  $0,25 (0,11-0,52)$ ; FIB-4  $0,97 (0,42-2,22)$ . Izvedli smo primerjavo vrednosti ELF, APRI in FIB-4 za zmerno fibrozo. ELF test je imelo v območju zmerne fibroze 31 preiskovancev, FIB-4 pa 9 preiskovancev in APRI nobeden.

Ugotovili smo, da je ELF test pokazal zmerno stopnjo fibroze pri treh četrtinah preiskovancev, FIB-4 samo pri četrtini, APRI pa pri nobenem. Izračun APRI in FIB-4 temelji na koncentracijah Tr, AST, ALT in GGT, ki so nespecifični markerji za spremembe v jetrnem tkivu. ELF test pa temelji na merjenju direktnih biomarkerjev jeternega tkiva, zato menimo, da je za oceno zmerne fibroze boljši, kar potrjujejo tudi naši izsledki. Potrebne pa so dodatne klinično podprte raziskave.

**Ključne besede:** ELF, APRI, FIB-4.

1. Avberšek Lužnik I, Štabuc B, Krhin B, Arzenšek D. ELF test - direktni biomarker fibroze jeter. Gastroenterolog 2020; vol. 24 (2): 75-85.

**P-9**

## SARS-CoV-2 protitelesa pri skupini prebivalcev Gorenjske

### Anti SARS-COV-2 in Gorenjska population group

**Anita Kustec, Branka Svetic**

OZG OE ZD Kranj, Diagnostični laboratorij, Kranj, Slovenija

E-mail: anita.kustec@zd-kranj.si

V Diagnostičnem laboratoriju ZD Kranj smo novembra 2020 verificirali kvantitativni elektrokemiluminiscentni imunološki test (ECLIA) za določanje celokupnih SARS-CoV-2 protiteles z namenom testiranja zdravstvenih delavcev po koronavirusni bolezni, pred pričetkom cepljenja. Test smo ponudili tudi kot samoplačniško storitev. Primerjali smo koncentracije SARS-CoV-2 IgG protiteles pri zdravstvenih delavcih, ki so imeli okužbo potr-

jeno s PCR testom in pri samoplačnikih po preboleli okužbi, brez podatkov o PCR testiranju.

Z ECLIA smo meritve protiteles izvedli v času od 3 do 4 tedne po okužbi pri 293 preiskovancih (99 moških, 194 ženskah). Povprečna starost preiskovancev je bila  $46,2 \pm 13,9$  let. Preiskovance smo razdelili v tri skupine: zaposleni ZD Kranj (N=91), zaposleni dom starejših občanov (DSO) Preddvor (N=37) in samoplačniki (N=165). Statistično analizo rezultatov smo izvedli z SPSS 21.0.

Rezultati meritev so podani kot povprečna vrednost (PV) in 95 % interval zaupanja (95%CI) in znašajo pri vseh preiskovancih (N=293)  $85,76 (75,97-95,67)$ , pri skupini ZD Kranj  $56,23 (42,07-70,39)$ ; pri skupini DSO  $91,28 (63,89-118,67)$  in pri samoplačnikih  $100,81 (86,93-114,69)$  IU/ml. Skupina samoplačnikov je imela značilno višja protitelesa kot zaposleni v ZD Kranj in DSO, ( $p=0,001$ ). Koncentracije protiteles se po spolu niso značilno razlikovale ( $p=0,774$ ).

Raziskave kažejo, da protitelesa, ki jih imunski sistem tvori ob okužbi s SARS-CoV-2, niso merilo zaščite pred ponovno okužbo, potrjujejo pa okužbo posameznika z virusom in odziv njegovega imunskega sistema na virus ali na cepljenje, zato bo laboratorij merjenje anti SARS-COV-2 obdržal v svojem katalogu preiskav.

**Ključne besede:** anti SARS CoV-2, ECLIA

**P-10**

## Overjanje hematološkega analizatorja v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor

### Verification of the hematology analyzer at the University Medical Center Maribor

**Petra Uljarevič, Mojca Pušnik, Valerija Domajnko**

UKC Maribor, Maribor, Slovenija

E-mail: mojca.pusnik18@gmail.com

Pred uvedbo analizatorja v rutinsko delo, je potrebno opraviti postopek overjanja. Delovna skupina za laboratorijsko hematologijo je pripravila dokument s smernicami za overjanje hematološkega analizatorja, kjer navajajo, da je pred začetkom rutinske uporabe potrebno preveriti vsaj natančnost in točnost. Natančnost je ponovljivost ali obnovljivost meritev. Ponovljivost za posamezne parametre KKS in DKS, smo preverili »v seriji«, »med serijami« in »iz dneva v dan«. Za preverjanje natančnosti v seriji smo izvedli 10 zaporednih meritev na 5 vzorcih periferne krvi. Za preverjanje natančnosti med serijami pa smo izvedli 5 zaporednih meritev na vseh 3 nivojih kontrolnih vzorcev, 5 zaporednih dni. Za oceno natančnosti meritev smo izračunali standardni odklon (SD) in koeficient variacije (KV %). Točnost je stopnja izmerjenega analita glede na referenčno vrednost. Določimo jo z odklonom izmerjene vrednosti od prave. Točnost smo preverili s stotimi predhodno analiziranimi vzorci (vzorci brez laboratorijskih posebnosti in

s patološkimi odstopanji: levkocitoza, levkopenija, nevtropenija, anemija, trombopenija). Z Bland-Altmanovo statistiko smo določili primerljivost rezultatov med hematološkima analizatorjema. Če med primerjanimi rezultati ni statistično značilne razlike, lahko obstoječi aparat zamenjamo z novim. Korelacijo med rezultati smo ocenili z regresijo (korelacijski koeficient). Glede na zastavljene kriterije sprejemljivosti rezultatov za natančnost in točnost smo ugotovili, da so rezultati parametrov za KKS in DKS ponovljivi, zelo dobro korelirajo in so statistično primerljivi. Izračunan CV% je v mejah dovoljenega odstopanja. Vrednost korelacijskega koeficienta blizu 1 pomeni zelo dobro korelacijo rezultatov. Bland-Altmanov diagram prikazuje večino rezultatov znotraj območja  $\pm 1.96SD$ , kar potrjuje dobro ujemanje med analizatorjema. Analizator je primeren za rutinsko delo.

#### P-11

### Vpliv genetske variabilnosti v CRP (rs1800947), TNFA (rs1800629) in IL6 (rs1800795) na raven vnetnih označevalcev pri bolnikih z zelo povišanimi vrednostmi lipoproteina(a)

#### *The influence of genetic variability in CRP (rs1800947), TNFA (rs1800629), and IL6 (rs1800795) on inflammatory markers in patients with very high lipoprotein(a) levels*

Inge Sotlar<sup>1</sup>, Tina Levstek<sup>1</sup>, Nik Podkrajšek<sup>1</sup>, Tamara Rojnik<sup>2</sup>, Miran Šebeščen<sup>2,3</sup>, Andreja Rehberger Likozar<sup>2</sup>, Katarina Trebušak Podkrajšek<sup>1,4</sup>

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

<sup>2</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za žilne bolezni, Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za kardiologijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Ljubljana, Slovenija

E-mail: inge.sotlar@mf.uni-lj.si

Kronično vnetje pomembno prispeva k razvoju in napredovanju ateroskleroze. Kljub temu pa patofiziološki mehanizmi, ki vodijo v nastanek pro-vnetnega stanja, še niso povsem razjasnjeni. Polimorfizmi posameznih nukleotidov lahko vplivajo na prepisovanje genov in posledično na raven vnetnih dejavnikov. Zato smo v raziskavi preučili vpliv polimorfizmov CRP rs1800947, TNFA rs1800629 in IL6 rs1800795, ki imajo potencialno vlogo pri patogenezi ateroskleroze, na raven C-reaktivnega proteina visoke občutljivosti (hsCRP), dejavnika tumorske nekroze- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in interleukina 6 (IL6) pred in po zdravljenju z zaviralci lipoproteina konvertaze subtilisin/keksin tipa 9 (PCSK9). V raziskavo smo vključili 69 bolnikov s stabilno koronarno arterijsko boleznijo

in z zelo povišanimi vrednostmi lipoproteina(a), ki so doživeli miokardni infarkt pred 50. letom starosti. Ob vključitvi so prejeli zaviralec PCSK9 (evolocumab ali alirocumab). Polimorfizme CRP rs1800947, TNFA rs1800629 in IL6 rs1800795 smo določili z metodo TaqMan, vnetni parametri pa so bili izmerjeni s standardnimi laboratorijskimi postopki. Raven vnetnih parametrov se ob vključitvi v raziskavo ni značilno razlikovala med bolniki z različnimi genotipi. V skladu s predhodnimi raziskavami tudi ni prišlo do signifikantne spremembe v ravni vnetnih dejavnikov po šestmesečnem zdravljenju z zaviralci PCSK9. Sprememba v ravni hsCRP in TNF- $\alpha$  po zdravljenju z inhibitorji PCSK9 prav tako ni bila odvisna od prisotnega genotipa, medtem ko je bila razlika v ravni IL6 statistično signifikantna ( $p = 0,05$ ) po zdravljenju, in sicer pri bolnikih z genotipom CC polimorfizma IL6 rs1800795, kar nakazuje na njegovo možno vlogo pri uravnavanju vnetja.

**Ključne besede:** genetska variabilnost, vnetje, lipoprotein(a)

#### P-12

### Komunikacija znanosti in stroke z javnostjo v času epidemije COVID-19

#### *Communicating science to the public during the COVID-19 pandemic*

Jasna Omersel<sup>1</sup>, Tijana Markovič<sup>1</sup>, Martina Gobec<sup>1</sup>, Simona Jurkovič Mlakar<sup>2</sup>, Lucija Ana Vrščaj<sup>1</sup>, Nataša Karas Kuželički<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>University of Geneva, Faculty of Medicine Pediatric Oncology and Hematology Unit, Geneva, Switzerland

E-mail: jasna.omersel@ffa.uni-lj.si

Poleg epidemije COVID-19, se je v družbi sočasno neobludljivo širila tudi 'infodemija'. Zato so se posamezniki soočali z dilemami, kje in kako dobiti zanesljive informacije v poplavi dezinformacij, ki so jih posredovali številni mediji, družbene skupine ali družbena omrežja. V odziv na to stanje, smo julija 2021 sodelavke Katedre za klinično biokemijo UL FFA ustanovile Facebook skupino Science Mamas Vaccine Forum. Namen skupine je bilo jasno in poljudno komuniciranje znanstvenih in strokovnih dejstev s področja diagnostike, terapije in cepljenja proti SARS-CoV2. Temeljno izhodišče skupine je bila spoštljiva komunikacija, razumljiv jezik in podajanje pravih, preverjenih informacij. Najaktualnejše teme smo predstavili v obliki grafičnih prikazov (shema cepljenj COVID-19, cepiva COVID-19 v nosečnosti, postopanje v primeru pozitivnih PCR in HAT testov). Za obvladovanje epidemije je namreč ključnega pomena zaupanje javnosti v zdravstveno in laboratorijsko stroko, saj so številni družbeni ukrepi temeljili na rezultatih PCR in hitrih antigenih testov SARS-CoV2. V okviru laboratorijskega področja so v javnosti poleg številnih nejasnosti o vrsti testa (PCR ali HAT), načinu odvzema vzorca, pomenu samega rezultata testov krožile tudi novice o škodljivosti jemanja nosno-žrelnega brisa, ter o toksičnosti in genotoksičnosti

etilen-oksida na vatiranih palčkah za odvzem brisa. Drugi val epidemije je prinesel teste dokazovanja protiteles proti SarsCoV2, rezultati le-teh pa so v javnosti povzročali dodatno zmedo. Zbežganost, negotovost in strah javnosti med epidemijo COVID-19 so nas motivirali, da smo se kot strokovni, znanstveni in pedagoški kader s področja farmacije in laboratorijske medicine družbeno aktivirali in s svojimi kompetencami širili strokovne informacije ter ustvarili varno in spoštljivo komunikacijsko okolje.

P-13

## Molekularno genetska analiza Beckwith-Wiedemann sindroma

### Molecular genetics of Beckwith-Wiedemann Syndrome

Maja Ficko<sup>1</sup>, Sara Bertok<sup>2</sup>, Gregor Nosan<sup>3</sup>, Tinka Hovnik<sup>1,4</sup>

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

<sup>2</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika Ljubljana, Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove, Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika Ljubljana, Klinični oddelek za neonatologijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta Ljubljana, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Ljubljana, Slovenija

E-mail: maja.ficko@kclj.si

Beckwith-Wiedemann sindrom (BWS, OMIM#130650) je klinično heterogeno obolenje, za katerega je značilna prekomerna rast in nagnjenost k razvoju tumorjev. Genetsko ozadje BWS je kompleksno, pri 50% bolnikov je vzrok znižana metilacija domene IC2 na maternalnem kromosomu. Paternalna uniparentalna disomija je vzrok bolezni v 20%. Hipermetilacija domene IC1 na maternalnem kromosomu je vzrok pri 5% bolnikov, ostali redki vzroki so mikrodelecije/mikroduplicacije, translokacije/inverzije ter spremembe v genu CDKN1C.

Genomsko DNA smo izolirali iz periferne krvi s komercialno dostopnim reagenčnim kompletom po predpisanih navodilih proizvajalca (Qiagen). Metilacijsko specifično MLPO (angl. MS-MLPA: *Multiplex ligation-dependent probe amplification*, MRC Holland) smo izvedli za določanje sprememb v številu kopij (angl. CNV: *Copy number variant*) in opredelitev metilacijskega statusa pri preiskovancu in starših. Molekularna analiza pri preiskovancu je pokazala heterozigotno delecijo upstream regulatornih elementov domene IC1, približne velikosti 510bp, normalen metilacijski status domene IC2 in hipermetilacijo domene IC1 na kromosomskem področju 11p15.5, kar je potrdilo BWS. S parentalno analizo smo pri starših ugotavljali izvor in pri mami potrdili enako delecijo kot pri sinu ter normalen vzorec metilacije obeh vtisnjenih domen kromosomskega področja 11p15.5. Rezultati

analiz so potrdili, da je mati nosilka opisane delecije, kar ustreza avtosomno dominantnemu načinu dedovanja.

Opisujemo primer novorojenca z izrazito makroglosijo značilno za BWS, pri katerem smo odkrili redek vzrok bolezni in potrdili njen izvor. MS-MLPA je ključna za potrditev diagnoze, saj poleg odkrivanja pogostejših vzrokov, omogoča odkrivanje redkejših vzrokov bolezni. Zgodnje odkrivanje in potrditev diagnoze skupaj s pravočasnimi, izboljšanimi možnostmi zdravljenja, zmanjša smrtnost bolnikov z BWS.

**Ključne besede:** Beckwith-Wiedemann sindrom, MS-MLPA

P-14

## Primer hude oblike malarije

### A case of severe malaria infection

Marjana Prah Krumpak, Elizabeta Božnar Alič

UKCL - KIKKB, Ljubljana, Slovenija

E-mail: MARJANA.PRAH@KCLJ.SI

Malaria is a dangerous febrile illness that can lead to serious complications and fatalities. It is most commonly caused by *Plasmodium falciparum*. We present a case of a 53 years old man, who returned from Uganda.

Based on history and clinical presentation, malaria was immediately suspected. Blood samples for thick and thin smear, haematological and biochemical testing were taken before the therapy initiation. All results were followed up for 11 days.

Trophozoites of *P. falciparum* were found in thin and thick blood smear. High parasitemia (13.7%) indicated a severe form of tropical malaria, also confirmed by thrombocytopenia ( $25 \times 10^9/L$ ) and metabolic acidosis. Parasitemia was the highest at day 2 (29.4%). The lowest level of haemoglobin (88 g/L) was measured at day 9, and of erythrocytes ( $3.01 \times 10^{12}/L$ ) at day 8. Total and direct bilirubin reached their maximum at day 6 (268 and 203  $\mu\text{mol}/L$ ), and alkaline phosphatase at day 11 (3.62  $\mu\text{kat}/L$ ). The patient also had elevated serum urea (54.8 mmol/L), creatinine (760  $\mu\text{mol}/L$ ) and inflammatory parameters. C-reactive protein reached its maximum at day 2 (246 mg/L), while procalcitonin (424.88  $\mu\text{g}/L$ ) and leucocyte maximum levels ( $25.5 \times 10^9/L$ ) were reached at day 3. The thin and thick blood film became negative at day 9.

Severe malaria can progress rapidly and cause death within hours or days. It is important to quickly determine species of *Plasmodium* and monitor the treatment success with measurements of parasitemia and other haematological and biochemical tests.

**Key words:** malaria, *Plasmodium falciparum*, parasitemia



## P-15

### Avtomatizacija in konsolidacija laboratorijskih procesov na primarni ravni

#### Automation and consolidation of laboratory processes at the primary level

Mateja Šter, Gregor Kurinčič, Darja Pungertnik

Zdravstveni dom Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

E-mail: mateja.ster@zd-lj.si

V prizadevanju za izboljšanje splošne laboratorijske učinkovitosti je bila v Zdravstvenem domu Ljubljana (ZDL) vzpostavljena konsolidirana laboratorijska mreža z osrednjim laboratorijem v središču. To je Diagnostični laboratorij enote Center, kamor se stekajo vzorci za izvedbo biokemijskih in imunokemijskih preiskav iz vseh 10 diagnostičnih laboratorijev. Dnevno število takih vzorcev je približno 1200. Zaradi tako velikega števila vzorcev je bil za optimalno in kakovostno obdelavo nujen prehod na visoko stopnjo avtomatizacije celotnega procesa. Uveden je bil sistem popolne laboratorijske avtomatizacije (angl. *Total Laboratory Automation, TLA*), ki je povezal sistem predanalitiške obdelave vzorcev z dvema integriranimi analizatorjema za izvajanje biokemijskih in imunokemijskih preiskav. Postavitev in zagon novega avtomatiziranega sistema Alinity proizvajalca Abbott je bila izvedena v mesecu oktobru in novembru 2021. V Sloveniji je bil to prvi tako velik sistem tega proizvajalca. Ta sistem sestavlja več samostojnih modulov, vsak opravlja specifično nalogo, med seboj so povezani v določenem logičnem vrstnem redu preko transportnega sistema – »sistema linij in vozičkov« za prevažanje vzorcev krvi. Procesu analitike sledi še samodejno shranjevanje vzorcev v hladilni enoti. Sistem Alinity je voden s programsko opremo AlinIQAMS (AMS), ki izboljšuje upravljanje s sistemom ter nadzor predanalitičnih, analitičnih in postanalitičnih delovnih procesov. Zagotovljeno je celovito sledenje vzorcem, upravljanje kontrole kakovosti in komuniciranje z laboratorijskim informacijskim sistemom. Z novim avtomatiziranim sistemom smo tako dosegli večjo standardizacijo predanalitičnih postopkov, razbremenitev zaposlenih in skrajšanje časa do izdaje rezultatov, obenem pa optimizacijo delovnih procesov in večjo učinkovitost laboratorija.

**Ključne besede:** Avtomatizacija, konsolidacija

## P-16

### Primer uporabe kazalnika kakovosti

#### An example of the quality indicator use

Marjana Prah Krumpak, Saša Bratož

UKCL - KIKKB, Ljubljana, Slovenija

E-mail: MARJANA.PRAH@KCLJ.SI

Blood sampling is the most commonly conducted invasive procedure in medicine. The quality and early patient management are crucial.

Alas, in order to optimize waiting times, it is often necessary to invest a great deal of effort in adequate facilities and human resources. The aim is to present the sampling of venous blood at the Clinical Institute for Clinical Chemistry and Biochemistry of the University Medical Centre in Ljubljana (KIKKB) and our efforts to improve the comprehensive patient management. The goal is to ensure safe, quality and rapid patient management, thus increasing the satisfaction of all involved parties. In order to meet our goals, it is important to have an adequate number of trained staff, optimal organization, facilities and equipment, in addition to the appropriate tools to monitor and improve the process. The procedure must be performed in line with recommendations, ensuring privacy, and it is also crucial for the phlebotomist to have appropriate communication skills and ingenuity in case of sudden events that often occur during the blood sampling.

Blood sampling is performed between 7am and 3pm, with no prescheduling, and the patient frequency is the highest in the morning. We are facing a shortage of staff, while the number of patients, with the exception of 2020, is increasing every year (2015:39.951; 2016:42.512; 2017:45.186; 2018:45.518; 2019:47.557; 2020:42.660; 2021:49.524).

Initially, we had only two sampling sites available, in the same room. Privacy was not ensured and employees were overloaded, which increased the possibility of injuries, errors and dissatisfaction. The Satisfaction Survey (score 1.0 - 5.0), used as a quality indicator, initially showed medium patient satisfaction, which has been improving with spatial optimization (2012:3.2; 2013:3.0; 2014:4.0; 2015:4.5; 2016:4.7; 2017:4.8; 2018:4.6; 2019:4.6). In 2014, we renovated the blood sampling facilities, thus acquiring three separate sampling sites that ensure complete privacy. We have introduced an electronic call system, which guarantees the scheduling of patients in fair order. Since the goal of our new quality indicator was not always reached (2015:0.87; 0.91; 0.91; 0.84; 2016:0.71; 0.73; 0.94; 0.91), we kept searching for improvements. Our employees were given an insight into the LIS waiting list, to ensure a more continuous workflow. We tried to ensure that the three sampling sites were constantly occupied, not only for time optimization but also to achieve greater satisfaction of both, patients and employees, who are often overworked. Due to staff shortages, we haven't always succeeded. In 2017, we increased staffing and introduced regular refresher trainings on the blood sampling technique for a larger number of employees. The monitoring of the quality indicator showed that the proportion of treated patients within the target time was sometimes better, sometimes worse (2017: 0.89; 0.89; 0.93; 0.88; 2018:0.76; 0.83; 0.96; 0.97; 2019:0, 97; 0.95; 0.82; 0.82), and above all, it depended on the occupancy level of all three sites. In 2020, we did not get a realistic picture, as we were working under exceptional circumstances due to the COVID pandemic. In order to avoid queues in the waiting room, we introduced the fourth sampling site and were thus able to take care of all the ongoing work and at the same time relieve the burden on employees. In 2021, we managed 49,524 patients, of which more than 97% were attended to within 30 minutes.

**Key words:** quality indicator, blood sampling, optimisation

P-17

## Prostaglandinski receptor EP4 – nov potencialni biomarker in terapevtska tarča v kronični limfocitni levkemiji

*Prostaglandin EP4 receptor as a potential novel biomarker and therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia*

Tijana Marković<sup>1</sup>, Alenka Šmid<sup>1</sup>, Helena Podgornik<sup>2</sup>, Damjan Avsec<sup>1</sup>, Irena Mlinarič-Raščan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, University Of Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>Department of Haematology, University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

E-mail: [tijana.markovic@ffa.uni-lj.si](mailto:tijana.markovic@ffa.uni-lj.si)

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is currently incurable disease with high inter-individual variability, which is reflected in the development of the disease, prognosis and response to the therapy. In our previous research we have shown that selective prostaglandin EP4 receptor agonists inhibited NF- $\kappa$ B signaling pathway, resulting in an increased caspase-mediated apoptosis of malignant B cells. Moreover, gene Ptger4, encoding the receptor EP4 was identified as a potential tumor suppressor. The aim of this study was to evaluate the EP4 receptor as a potential novel biomarker and therapeutic target for the treatment of CLL.

EP4 receptor agonist PgE1-OH exerted cytotoxic effects in all CLL cells (N=151) with EC50 values ranging from 2 to 55  $\mu$ M, indicating inter-individual variability in response. The analysis of the results revealed sex-dependent sensitivity of CLL cells to PgE1-OH, which was more cytotoxic to the cells of male compared to female donors. PgE1-OH was also more cytotoxic toward the cells of the carriers of the variant A allele of EP4 receptor expression-modulating polymorphism rs4495224. Moreover, male patients had higher expression levels of Ptger4, coding for EP4 receptor, compared to female patients as did the donors with the rs4495224 AA genotype compared to those with rs4495224 AC/CC genotype. A weak, but significant correlation between an increased expression of the Ptger4 gene and lower EC50 values was also shown.

In conclusion, EP4 receptor was identified as a promising therapeutic target and potential biomarker in CLL.

**Key words:** biomarker, prostaglandin EP4 receptor, chronic lymphocytic leukemia

P-18

## Določanje multimerne sestave von Willebrandovega faktorja z delno-avtomatizirano gelsko elektroforezo

*Multimer analysis of von Willebrand factor with semi-automated gel electrophoresis*

Anja Švigelj, Alenka Trampuš Bakija

UKC Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Ljubljana, Slovenija

E-mail: [anja.svigelj@kclj.si](mailto:anja.svigelj@kclj.si)

Von Willebrandova bolezen (vWB) je najpogostejša prirojena motnja strjevanja krvi. Vzroki zanjo so lahko različni – odsotnost, pomanjkanje ali motnja v delovanju von Willebrandovega faktorja (vWF). Poznamo 3 tipe vWB – tip 1 (najpogostejši), tip 2 (s podtipi 2A, 2B, 2N in 2M) in tip 3 (najredkejši). Za opredelitev tipa in podtipa vWB je v stopenjski laboratorijski diagnostiki potrebna določitev multimerne sestave vWF (1). Najpogosteje se uporablja metoda, ki temelji na elektroforezni ločbi plazemskih proteinov na SDS (angl. *sodium dodecyl sulfate*) agaroznem gelu, prenosu proteinov na nitrocelulozno membrano in encimsko imunoluminiscenčni detekciji. Metoda je kompleksna, nestandardizirana, časovno zamudna (3-4 dni) in potrebuje specifično opremo ter kader z veliko izkušnjami (2). Na Kliničnem inštitutu za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike UKC Ljubljana, smo uvedli novo metodo določanja multimerne sestave vWF proizvajalca SEBIA (aparatus HYDRASYS 2 Scan Focusing). Temelji na delno-avtomatiziranem postopku, z uporabo pred-pripravljenega agaroznega gela (Hydragel 11 von Willebrand multimer, Sebia). Pri tem smo analizirali vzorce znanih bolnikov z opredeljeno vWB – tip 1, tip 2 in tip 3. Pri različnih tipih vWB smo natančno določili število multimerov vWF z majhno, srednjo in veliko molekulsko maso. Z uvedbo metode in delno-avtomatizacijo postopka smo izvajanje standardizirali. Prednosti nove metode so: uporaba pred-pripravljenega agaroznega gela in reagentov, delno-avtomatiziran sistem analize, krajši čas do rezultata (1 dan), denzitometrija za pomoč in natančnost pri interpretaciji izvidov, dobra ponovljivost in sledljivost meritev. Metoda omogoča natančno opredelitev sestave vWF in je primerna za uporabo v specializiranih laboratorijih za celostno diagnostiko vWB.

**Ključne besede:** vWB, multimerna sestava

P-19

## Uporabnost analizatorja Microsemi CRP v laboratoriju terciarne bolnišnice

### Usefulness of Microsemi CRP analyzer in tertiary care hospital

Alenka Trampus Bakija, Anja Švigelj

UKC Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Ljubljana, Slovenija

E-mail: alenka.trampus@kclj.si

V rutinski diagnostiki raznih obolenj pri otrocih pogosto ob določitvi hemograma naročnik zahteva tudi določitev C-reaktivnega proteina (CRP). Slednjega običajno določamo iz seruma, kar pomeni ob odvzemu krvi z EDTA še dodatno epruveto za določitev CRP. Pri otrocih zato predstavljajo sistemi določitve CRP iz iste epruvete prednost zaradi enostavnejšega odvzema, vzorec je lahko tudi kapilarna kri. V Kliničnem inštitutu za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike UKC Ljubljana smo ocenili uporabnost analizatorja Microsemi CRP (Horiba), ki omogoča sočasno določitev hemograma in CRP iz istega vzorca polne krvi. Rezultate smo primerjali z obstoječim načinom testiranja (hemogram z XT 2000i, Sysmex in CRP s QuikRead CRP, Orion Diagnostica). S primerjavo analiz 150 vzorcev krvi smo ugotovili za vse določane parametre odlično korelacijo med primerjanimi metodami ( $r > 0,970$ ). Prednost sistema Microsemi CRP je v majhnem volumnu aspiriranega vzorca za analizo (18  $\mu\text{L}$ ), hitri analizi hemograma in DKS (1 minuta), uporabniku zelo prijazni programski opremljeni in enostavnemu rokovanju z analizatorjem. Slabosti analizatorja pa so: možnost merjenja samo z odpiranjem epruvete, potreba po pogostem menjavanju nastavkov ob uporabi različnih tipov epruvet, možnost izvedbe le 3-delne DKS in daljši čas za merjenje CRP v primerjavi z obstoječo metodo (15 testov/uro). Pri visokih vrednostih CRP ( $> 200 \text{ mg/L}$ ) je priporočeno redčenje vzorca, ki pa zahteva prevelik volumen krvi v primeru uporabe mikroeprevet (200  $\mu\text{L}$ ) ter dodatno preračunavanje rezultatov, kar poveča možnost napak in podaljšuje čas do izdaje izvida. Zaključujemo, da analizator Microsemi CRP daje zanesljive rezultate, a je primeren predvsem za delo v manj obremenjenih laboratorijih na primarni ravni.

P-20

## Pregled laboratorijskih preiskav celiakije na Kliničnem inštitutu za specialno laboratorijsko diagnostiko v letu 2021

### Overview of laboratory tests of coeliac disease at Clinical institute of special laboratory diagnostics in 2021

Tamara Grgič<sup>1</sup>, Ana Grom<sup>1</sup>, Maruša Debeljak<sup>1,2</sup>, Tinka Hovnik<sup>1,2</sup>, Tine Tesovnik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, KISLD, Ljubljana, Slovenija

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

E-mail: tamara.grgic@kclj.si

Celiakija je avtoimunska bolezen, ki najpogosteje prizadene tanko črevo in nastane kot posledica uživanja glutena pri osebah z genetsko predispozicijo. Ocenjujejo, da ima celiakijo nekje 1 % splošne populacije in ni le bolezen otroške dobe, saj v različnih kliničnih oblikah prizadene ljudi vseh starosti. Dokončna potrditev celiakije je kompleksna in osnovana na kombinaciji kliničnih, seroloških, genetskih in histopatoloških izsledkov (biopsija). V nadaljevanju predstavljamo celovito laboratorijsko diagnostiko celiakije in kolikšen delež preiskav na leto predstavlja genetsko testiranje HLA-DQ2/DQ8, saj ESPHGAN smernice za diagnostiko celiakije od leta 2020 določajo, da genetsko testiranje pri otrocih in mladostnikih s pozitivno serologijo ni več obvezno. Stopensjska laboratorijska diagnostika celiakije poteka tako, da se v vzorcih seruma določi z encimsko-immunskim testom protitelesa proti tkivni transglutaminazi (TGA) razreda IgA, z imunokromatografskim testom protitelesa TGA razreda IgA in IgG, s tehniko indirektno imunofluorescence pa se opredelijo antiendomizijska protitelesa (EMA-IgA). Molekularno-genetsko tipizacijo za celiakijo značilnih alelov HLA-DQ2 (DQA1\*05/DQB1\*02) in HLA-DQ8 (DQA1\*03/DQB1\*0302) se izvede v vzorcu genomske DNA s sondami TaqMan v verižni reakciji s polimerazo v realnem času, vendar le za izključevanje celiakije pri ljudeh z visokim tveganjem (SBT1, ostala avtoimuna obolenja) in pri bolnikih pri katerih težko postavimo diagnozo zaradi nasprotujočih si izvidov. V letu 2021 smo izvedli 13684 laboratorijskih testov pri diagnostiki celiakije. 8744 (64 %) vzorcem smo določili koncentracijo protiteles TGA-IgA, 629 (5 %) vzorcem smo dokazovali protitelesa TGA-IgA+IgG, 3959 (29 %) vzorcem protitelesa EMA-IgA in 352 (3 %) vzorcem genotip HLA-DQ2/DQ8. Rezultati potrjujejo nizek delež molekularno-genetskih preiskav, kar sledi smernicam ESPHGAN.

**Ključne besede:** celiakija, laboratorijska diagnostika

P-21

## Analiza sprememb v številu kopij genov povezanih s hipogonadotropnim hipogonadizmom z metodo MLPA

### Analysis of copy number variation in genes connected with hypogonadotropic hypogonadism by MLPA

Špela Zlodej<sup>1</sup>, Maja Ficko<sup>2</sup>, Magdalena Avbelj Stefanija<sup>3</sup>, Katarina Trebušak Podkrajšek<sup>2,4</sup>, Tinka Hovnik<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija

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

<sup>3</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove, Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Ljubljana, Slovenija

E-mail: spela.zlodej.sso@gmail.com

Hipogonadotropni hipogonadizem je redka klinično heterogena bolezen, pri kateri gre za moteno izločanje hormonov hipotalamusa ter hipofize. Nastane zaradi mutacij v različnih genih, ki kodirajo proteine, odgovorne za normalno sintezo gonadotropin sproščujočega hormona ter njegovo izločanje in delovanje. Poznamo prirojeno in pridobljeno obliko hipogonadotropnega hipogonadizma. Prirojeno obliko nadalje ločimo glede na prisotnost občutka za vonj. Če je le-ta odsoten, imenujemo takšno obliko Kallmannov sindrom, v nasprotnem primeru pa idiopatski hipogonadotropni hipogonadizem. Klinični znaki hipogonadotropnega hipogonadizma so odvisni od različnih dejavnikov (spol, starostno obdobje, obseg pomanjkanja hormonov). Pri mladostnikih se znaki kažejo z motnjami sekundarne pubertete, saj ta ne nastopi ali zakasni, pri odraslih se srečujemo z neplodnostjo, impotenco, amenorejo... Analizirali smo izbrane gene pacientov s kliničnimi znaki, značilnimi za hipogonadotropni hipogonadizem. Z drugimi do sedaj uporabljene molekularne diagnostične metode nismo uspeli potrditi sprememb v analiziranih genih in s tem odkriti vzroka za klinično sliko. Izbrali smo metodo MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). Komercialna kita (MRC Holland), ki smo jih uporabili za delo, sta namenjena določanju delecij ali duplikacij v genih, povezanih s Kallmannovim sindromom; KALL-1, FGFR1, GNRGR, KISS1R, GNRH1, PROK2 in PROKR2. Pri enem od preiskovancev smo odkrili delecijo v območju gena KALL1, ki je do sedaj narejene genetske preiskave še niso uspele zaznati, in s tem potrdili diagnozo Kallmannov sindrom. Postavitev diagnoze je pomembna za pravilno terapijo in individualizirano hormonsko in drugo zdravljenje. V večini primerov normalizacija hormonov vodi v normalno plodnost. Zdravljenje je doživljenjsko, pričakovana življenjska doba ne odstopa od povprečja.

**Glavne besede:** MLPA, hipogonadotropni hipogonadizem, Kallmannov sindrom

P-22

## Kazalniki kakovosti predanalitične faze; rezultati ankete Delovne skupine za predanalitiko pri SZKKLM

### Quality indicators for preanalytical phase; the survey results of the Working group for preanalytical phase at SZKKLM

Timea Tomšič<sup>1,6</sup>, Eva Fliser<sup>2,6</sup>, Lidija Gobec<sup>3,6</sup>, Greta Štrakl<sup>4,6</sup>, Alenka France Štiglic<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup> Zdravstveni dom Trebnje, Diagnostični laboratorij, Trebnje, Slovenija

<sup>2</sup> Univerzitetni klinični center Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Maribor, Slovenija

<sup>3</sup> Splošna bolnišnica Celje, Oddelek za laboratorijsko medicino, Celje, Slovenija

<sup>4</sup> Splošna bolnišnica Murska Sobota, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Murska Sobota, Slovenija

<sup>5</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>6</sup> SZKKLM, Delovna skupina za predanalitiko (DS-PRE)

E-mail: eva.fliser@ukc-mb.si

Delovna skupina za predanalitiko (DS-PRE) je na spletni strani SZKKLM objavila predlog poenotenja kazalnikov kakovosti predanalitične faze (kazalniki) v skladu s priporočili IFCC. Urejena je njihova implementacija v laboratorijske informacijske sisteme (LIS; Labis, Cobis, Arilab) ter njihovo statistično vodenje. DS-PRE želi pričeti z vodenjem dveh kazalnikov na nacionalni ravni in tako vzpodbuditi laboratorije k prevzemanju in vodenju navedenih kazalnikov.

DS-PRE je pripravila spletni vprašalnik s pomočjo programa Survey Monkey. Sodelovanje laboratorijev je bilo anonimno in prostovoljno. S vprašalnikom je delovna skupina želela izvedeti delež zavrženih hemoliziranih vzorcev in delež koaguliranih vzorcev z antikoagulantom v letu 2021. Prav tako je želela izvedeti način ugotavljanja ter kriterij hemolize v laboratorijih.

V anketi je sodelovalo 21 laboratorijev (11 iz primarnega, 7 iz sekundarnega, 2 iz terciarnega nivoja in 1 zasebni laboratorij). 3 laboratoriji (3/21) so odgovorili, da nimajo statističnih podatkov o deležu zavrženih hemoliziranih vzorcev, 4 laboratoriji (4/21) nimajo podatka o deležu koaguliranih plazemskih vzorcev. 18 laboratorijev (18/21) je navedlo delež hemoliziranih vzorcev v razponu od 0,01-97% in 16 laboratorijev (16/20) delež koaguliranih vzorcev z antikoagulantom v razponu od 0-2,0 %. Laboratoriji uporabljajo različne načine ugotavljanja hemolize.

Laboratoriji na področju medicinske biokemije v Sloveniji večino še ne beležijo predanalitskih neskladnosti v LIS-u v skladu s IFCC priporočili. To potrjuje majhno število udeležencev ankete in manjkajoči statistični podatki nekaterih sodelujočih laboratorijev. Slednji večinoma beležijo podatke o neskladnostih, vendar njihovi LIS-i še ne omogočajo vodenja kazalnikov. Zaradi velike variabilnosti deležev hemoliz predvidevamo možnost napak pri izračunu in/ali vnosu podatkov v anketo.



P-23

## Spremljanje in prepoznavanje virusnih različic SARS-CoV-2

### Monitoring and identification of SARS-CoV-2 variants

Robert Šket<sup>1</sup>, Jera Stritar<sup>1</sup>, Tine Tesovnik<sup>1</sup>, Barbara Jenko Bizjan<sup>1,2</sup>, Ana Grom<sup>1</sup>, Nina Kulić<sup>1</sup>, Mojca Zrimšek<sup>1</sup>, Eva Kozjek<sup>2</sup>, Barbara Slapnik<sup>1</sup>, Špela Kert<sup>1</sup>, Jernej Kováč<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

E-mail: robert.sket@kclj.si

Od začetka izbruha virusa SARS-CoV-2, ki povzroča bolezen COVID-19, Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) sodeluje s strokovnimi laboratoriji, z namenom vzpostavitve testiranja pojavnosti virusa in spremljanja njegove diverzifikacije v virusne različice. Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrične klinike, UKCLj, aktivno sodeluje pri monitoringu virusa tako v matični ustanovi, kot na nacionalnem nivoju z namenom spremljanja pojavnosti virusnih različic tako pri pacientih in osebnju kliničnega centra, kot v splošni populaciji ter z namenom omejevanja širjenja virusa znotraj UKCLj. Na podlagi števila pozitivnih testiranj se sprejemajo in prilagajajo ukrepi za zajezitev širjenja virusa. Pri sledenju pojavnosti se izvaja hitri qPCR test za odkrivanje prisotnosti nukleinske kisline brez predhodne izolacije virusa in brisih nazofarinksa posameznikov. Pri epidemiološkem sledenju virusnih različic se izvaja sekvenciranje pozitivnih primerov bodisi z neposrednim sekvenciranjem bodisi s pomnožitvijo ciljnega virusnega genoma ter nadaljnjim visoko-pretočnim sekvenciranjem naslednje generacije (>1000 vzorcev na teden) ali sekvenciranjem na pori (čas analize <12 ur). Od decembra 2020 do aprila 2022 je bilo predvsem za potrebe UKCLj z namenom obvladovanja bolnišničnih okužb opravljenih >135000 qPCR testov. Nadalje je bilo v sodelovanju z Nacionalnim laboratorijem za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) ter vzorci iz UKCLj sekvenciranih >25000 vzorcev. Pri tem je bilo identificiranih pet različic virusa SARS-CoV-2, opredeljenih kot skrb vzbujajoče različice (VOC), ki so v Sloveniji prevladovala v različnih obdobjih. To so različica Alfa (januar 2021), Beta (februar 2021), Delta (april 2021), ki je povzročila zaskrbljenost zaradi zmanjšane učinkovitosti cepiv in protiteles, ter različica Omicron (december 2021), pri kateri je bilo povečano tveganje za ponovno okužbo, ki pa je običajno blažjega poteka od prve epizode. Sledenje pojavnosti virusa in identifikacija VOC sta se pokazali kot ključni pri omejevanju širjenja virusa tako v matični ustanovi, kot na nacionalnem nivoju.

P-24

## Nacionalni program populacijskega presejanja na družinsko hiperholesterolemijo pri predšolskih otrocih

### National Population Screening Program for Familial Hypercholesterolemia in Preschool Children

Urša Šuštar<sup>1</sup>, Matej Mlinarič<sup>1</sup>, Jernej Kováč<sup>2</sup>, Katarina Sedej<sup>3</sup>, Barbara Jenko Bizjan<sup>2</sup>, Katarina Trebušak Podkrajšek<sup>2,4</sup>, Tadej Battelino<sup>1,4</sup>, Urh Grošelj<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>UKC Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>UKC Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup>Zdravstveni dom Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

<sup>5</sup>Stanford University, Department of Cardiovascular Medicine, Stanford, ZDA

E-mail: ursa.sustar.lab@kclj.si

Družinska hiperholesterolemija (DH) je genetska motnja, ki se kaže s povišanimi vrednostmi holesterola in povečuje tveganje za prezgodnji pojav bolezni srca in ožilja. V Evropi je trenutno več kot 2 milijona nediagnosticiranih posameznikov z DH. Večjo stopnjo odkrivanja bolnikov z DH lahko dosežemo z učinkovitim presejalnim programom za DH.

V Sloveniji imamo 3-stopenjski program presejanja predšolskih otrok na DH. V našo analizo so bili vključeni otroci, rojeni med letoma 2006-2013. V prvi stopnji programa se na primarni ravni pomeni vrednosti holesterola pri 5-letnih otrocih. Učinkovitost programa smo evalvirali na 3,782 otrocih iz regij po vsej Sloveniji. Izmed napotenih otrok na Pediatrično kliniko UKC Ljubljana smo genetsko analizo izvedli pri 813 otrocih. V tretji stopnji presejalnega programa pa smo genetsko analizo izvedli še pri 99 starših otrok s pozitivnim genetskim izvidom.

Ugotovili smo, da ima 91.1% otrok v Sloveniji pred vstopom v šolo pomejane vrednosti holesterola. Med našimi preiskovanci je bilo 219 otrok pozitivnih in 42 otrok heterozigotov za varianto neznanega kliničnega pomena v genih, povezanih z DH. Pri več kot 90% družinah, smo pri staršu z višjimi vrednostmi holesterola potrdili družinsko varianto, ki smo jo odkrili že pri otroku. Na podlagi naših podatkov, pridobljenih iz programa presejanja na DH, smo ocenili prevalenco DH 1/431 (96% CI: 1/391-1/472). Strošek novo odkritega bolnika upoštevajoč vse tri stopnje programa je bil 860€.

Univerzalni nacionalni program presejanja na DH skupaj s kaskadnim presejanjem staršev in sorojencev se je izkazal za učinkovito in preprosto strategijo za odkrivanje bolnikov z DH.

P-25

## Problematika določanja LDL-holesterola pri pacientu z boleznijo jeter

### The problem of LDL-cholesterol measurement in a patient with liver disease

Nina Cugmas

Oddelek za laboratorijsko medicino, Splošna bolnišnica Celje, Celje, Slovenija

E-mail: nina.cugmas@sb-celje.si

LDL-holesterol izračunavamo s Friedewaldovo formulo, v primeru omejitev uporabe enačbe pa ga določimo direktno s homogeno metodo merjenja. Homogeni testi imajo certifikat CRMLN (Cholesterol Reference Method Laboratory Network) in ustrezajo kriterijem NCEP (National Cholesterol Education Program), vendar v CRMLN študije niso bili vključeni pacienti z neobičajnimi hiperlipidemijami ter pacienti z boleznimi ledvic in jeter. Pri slednjih so pogosto prisotni lipoproteini z atipičnimi lastnostmi in zanje je značilna slabša specifičnost homogenih metod določanja LDL-hol.

Pri 71-letnem pacientu z boleznijo jeter smo v Splošni bolnišnici Celje z reagenti firme Roche Diagnostics določili koncentracije trigliceridov 5,9 mmol/L, holesterola 16,9 mmol/L, HDL-hol 0,2 mmol/L in LDL-hol 0,6 mmol/L. Z reagentom firme Denka Seiken smo izmerili koncentracijo sdLDL-hol nad 10,4 mmol/L. Zaradi nizke vrednosti LDL-hol, ki je bila neskladna z vrednostjo sdLDL-hol, smo meritev LDL-hol ponovili z reagentom Siemens Healthcare Diagnostics Dimension Vista. Vrednost izmerjenega LDL-hol je bila 16,3 mmol/L. Med meritvami LDL-hol, izvedenimi s homogenimi testi različnih proizvajalcev, lahko pride do velikih razlik in nepravilnih rezultatov, še posebno kadar imamo vzorec pacienta z boleznijo jeter, ki povzroči motnjo v presnovi lipidov.

Zaključek: Določeni homogeni testi za določitev LDL-hol izkazujejo slabo specifičnost pri vzorcih z neobičajno sestavo lipoproteinov, zato se njihova uporaba ne priporoča za takšne vrste vzorcev.

1. Remaley AT, Dayspring TD, Warnick GR. Lipids, lipoproteins, apolipoproteins and other cardiovascular risk factor. In: Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 6th ed. Elsevier; 2018. p. 576-88.

P-26

## Medlaboratorijski transport biološkega materiala z brezpilotnim letalom - dronom

### Interlaboratory transport of biological material by drone

Jure Belak

Bolnišnica Topolšica, Topolšica, Slovenija

E-mail: jure.belak@b-topolsica.si

V Bolnišnici Topolšica že vrsto let sledimo sodobnim rešitvam na področju digitalizacije v zdravstvu, zaradi česar smo vodilna

in hkrati referenčna ustanova na tem področju v Sloveniji. Digitalizacijo vidimo kot ključno orodje pri zagotavljanju varnosti bolnikov in doseganju najvišje stopnje kakovosti njihove obravnave. Ob vseh možnostih, ki jih ponuja sodobna tehnologija in glede na naše vsakodnevnne potrebe po sodelovanju z zunanjimi izvajalci laboratorijske diagnostike, razmišljamo in iščemo rešitve v načinu transporta biološkega materiala, zlasti s transportom s pomočjo dronov oziroma brezpilotnih letalnikov. Transport z dronom vidimo kot varen in hiter način za dostavo bioloških vzorcev na mesto analize in s tem hitrejšo pridobitev rezultatov naročenih preiskav, kar pomeni pospešitev bolnikove obravnave. Ustrezno hranjen in zaščiteno biološki material bi pri uporabi drona več kot dobrodošlo ponujal 24/7 transport, ki je neodvisen od zastojev in drugih nevarnosti na cesti, zmanjšane kadrovske zasedbe ali drugih logističnih težav. Lahko pomeni tudi finančni prihranek, še posebej če danes za omenjene transporte ves čas namenimo zaposlenega in avto, katerega strošek vzdrževanja ni zanemarljiv, da nenehna višanja cene goriv ne omenjamo. Še posebej bi bila realizacija takšne organizacije transporta uporabna in ekonomsko najugodnejša ob povezovanju večine izvajalcev laboratorijske diagnostike po državi ali pa vsaj regijsko. Zakonodajca EU, ki ureja področje sistemov brezpilotnih zrakoplovov, omogoča takšno prakso. Čeprav je v zakonodaji natančno določeno, kakšni so pogoji za letenje na daljših razdaljah, so takšni leti v praksi izvedljivi v omejenem obsegu, saj v EU še ni izdelanih ustreznih standardov. Še nekaj let nazaj smo lahko električne avtomobile videli le v filmih in vse skupaj se je zdelo kot precej oddaljena prihodnost, danes pa jih dnevno srečujemo na cesti. In če se nam v tem trenutku zdi ideja o uporabi brezpilotnega letalnika za transport biološkega materiala le kot dobra scena v znanstveno fantastičnem filmu, lahko z razmišljanjem, pogovorom in iskanjem dobrih idej na to temo, počasi tlakujemo novo prakso laboratorijske medicine v prihodnosti.

P-27

## Serum antioxidant enzyme activities in patients with COVID-19 infection with mild symptoms related to age

Leonard Kurti, Genzane Mucaj Kurti, Iliriana Osmani, Ariana Kelmendi

Institute of Clinical Biochemistry, Clinical University Center of Kosovo, Kosovo

E-mail: genzane Kurti@gmail.com

Chronic degenerative diseases, as well as infectious diseases, such as viral respiratory infections, include oxidative processes. Antioxidants work by scavenging reactive oxygen species (ROS) and blocking oxidant-producing enzymes to counteract the effects of oxidants. COVID-19 incidence, development, and severity are all influenced by the overproduction of reactive oxygen species (ROS) and the depletion of antioxidant mechanisms.

The aim of the present study was to compare antioxidant enzyme activities (superoxide dismutase: SOD, glutathione peroxidase:

GPx and catalase: CAT) between a group of 40 elderly patients (60 - 80 years old), a group of 40 adult patients (25 – 40 years old) with COVID-19 infection and mild symptoms.

The levels of GPx, SOD, and CAT were found to be lower significantly in the elderly patients groups compared to the adults ( $p < 0.001$ ;  $25.68 \pm 1.63$  vs.  $35.98 \pm 4.03$ ,  $2.52 \pm 0.41$  vs.  $5.36 \pm 0.52$ , and  $94.72 \pm 5.41$  vs.  $131.11 \pm 5.77$ , respectively).

COVID-19 patients are more likely to have reduced levels of antioxidant compounds as a result of their increased use in counteracting the detrimental effects of free radicals. Furthermore, COVID-19 infection combined with other comorbidities, such as high blood pressure and diabetes, increases the risk of oxidative stress, therefore antioxidant supplementation may be advantageous to COVID-19 patients.

## P-28

### Type 2 Diabetes Mellitus and Heart - a coronary artery stenosis risk association

Pradeep K. Dabla<sup>1</sup>, Dharmshel Shrivastv<sup>2</sup>, Desh Deepak Sing<sup>2</sup>, Vimal Mehta<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, G. B. Pant Institute of Postgraduate Medical Education & Research (GIPMER), Associated Maulana Azad Medical College, GNCTD India

<sup>2</sup>Amity Institute of Biotechnology, Amity University Rajasthan, Rajasthan, India

<sup>3</sup>Department of Cardiology, G. B. Pant Institute of Postgraduate Medical Education & Research (GIPMER), Associated Maulana Azad Medical College, GNCTD India

E-mail: pradeep\_dabla@yahoo.com

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death globally. In condition of type 2 diabetic mellitus (T2DM), the prevalence of cardiovascular disease increase parallelly with the rise of metabolic complication. Literature available suggests that coronary artery disease (CAD) patients with T2DM shows higher

incidence of left main stem and multivessel disease. The current study was conducted in tertiary care specialized hospital in Delhi, India where we compared the level of percent stenosis in arteries which supplies blood in and around the heart in CAD patients with and without T2DM. We enrolled total of eighty age sex matched diagnosed coronary artery disease patients, out of which 40 were CAD patient with T2DM (group I) and the rest 40 were CAD nondiabetic patients (group II). The level serum HbA1c  $>6.5$  was considered as diabetic and  $<6.5$  considered as non-diabetic. The coronary angiography was performed by Judkin's approach. The significant difference was observed in serum HbA1c and random blood sugar level between group I and group II ( $p < 0.001$ ). In both group I and II, the majority of patients were diagnosed with single vessel disease. The significant difference was observed in left circumference artery stenosis ( $p = 0.007$ ) between group I and group II. Further, the Pearson's correlation coefficient shows the significant and positive association between stenosis in left circumference artery and serum HbA1c level ( $r = 0.399$ ,  $p = 0.02$ ). In conclusions, our study substantiates the significant level of stenosis in coronary arteries of diabetic patients. However, the further prospective analysis on larger population size will be needed to strengthen such conclusion and significant association.

**Key words:** coronary artery disease (CAD), coronary artery stenosis, coronary angiography, type 2 diabetic mellitus (T2DM), association study







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 članke ter aktual-

ne 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@szkkkm.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 najnovjših 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,
- telefonsko številko in 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*.

## 4. 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/>



# Predanost družbe Takeda redkim boleznim.

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

Bleiweisova cesta 30

1000 Ljubljana, Slovenija

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

Better Health, Brighter Future





analizator Atellica DCA

# Kompakten. Prenosljiv. Razširljiv. Prilagodljiv.

Pionirji na področju testiranja HbA1c predstavljajo analizator za diagnozo sladkorne bolezni s snemljivim zaslonom, ki prinaša klinična spoznanja neposredno do bolnikov.

[siemens-healthineers.com/diabetes](https://www.siemens-healthineers.com/diabetes)

Atellica je blagovna znamka družbe Siemens Healthcare Diagnostics Inc., 40-21-DX-823-76-2. ©Siemens Healthcare Diagnostics Inc., 2021, H00D05162003270419



## Tudi to je zdaj mogoče na mestu oskrbe

### Enostavna razširljivost

- modularna zasnova s snemljivim zaslonom, ki omogoča povezavo do treh modulov
- kompaktni analizator z žično in brezžično LIS/HIS/povezljivostjo

### Izboljšana izkušnja bolnikov

- velikost vzorca za test HbA1c: 1- $\mu$ L
- 4 minute do rezultatov testa HbA1c
- vgrajeni grafikoni trendov za pomoč pri posvetovanju in kliničnem odločanju

### Dokazana učinkovitost

- rezultati laboratorijske kakovosti\* z uporabo uveljavljene tehnologije
- zaščitni ukrepi, ki omogočajo pravilno obdelavo vzorcev in pomagajo preprečevati predanalitične napake

\* Rezultati so primerljivi ali enakovredni tistim, ki jih daje osrednja laboratorijska oprema.

Izdelki/funkcije (navedene v tem dokumentu) niso komercialno na voljo v vseh državah. Njihove razpoložljivosti v prihodnosti ni mogoče zagotoviti.

**SIEMENS**  
Healthineers



# IT'S MORE THAN A TEST.

IT'S THE FIRST LAB-BASED MILD TRAUMATIC BRAIN INJURY (mTBI) BIOMARKER ASSAY OF ITS KIND.



**It's confidence**—an objective result with high sensitivity to detect blood-based biomarkers of mild brain injury within 12 hours of head trauma—giving clinicians the power to predict the absence of intracranial lesions in adult patients with suspected mild traumatic brain injury.<sup>1</sup>



**It's optimizing care and resources**—with the potential to reduce unnecessary CT scans by up to 40%.<sup>1,2</sup> Protect patients from a costly procedure that exposes them unnecessarily to radiation.<sup>1,3-5</sup>



**It's a more efficient ER and a better experience for patients and their families.** When physicians are empowered to accurately assess the absence of intracranial lesions without a CT scan, it may help them discharge patients faster from the emergency room—increasing patient throughput and reducing length of stay.<sup>1,6</sup>

**Add Alinity i TBI to clinical evaluation.\***  
**So patients can get back to what matters most to them.**

\*Alinity i TBI is used in conjunction with other clinical information.

**REFERENCES:** **1.** Alinity i TBI H22974R01. Instructions for use. Abbott Ireland Diagnostics Division. Sligo, Ireland; October 2021. **2.** Data on file at Abbott. **3.** Bazarian JJ, Biberthaler P, Welch RD, et al. Serum GFAP and UCH-L1 for prediction of absence of intracranial injuries on head CT (ALERT-TBI): a multicentre observational study. *Lancet Neurol.* 2018;17(9):782-789. doi:10.1016/S1474-4422(18)30231-X **4.** Wang KKW, Kobeissy FH, Shakkour Z, Tyndall JA. Thorough overview of ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 and glial fibrillary acidic protein as tandem biomarkers recently cleared by US Food and Drug Administration for the evaluation of intracranial injuries among patients with traumatic brain injury. *Acute Med Surg.* 2021;8(1):e622. doi:10.1002/ams2.622 **5.** Bazarian JJ, Welch RD, Caudle K, et al. Accuracy of a rapid GFAP/UCH-L1 test for the prediction of intracranial injuries on head CT after mild traumatic brain injury. *Acad Emerg Med.* 2021;10.1111/acem.14366. doi:10.1111/acem.14366 **6.** Michelson EA, Huff JS, Loparo M, et al. Emergency department time course for mild traumatic brain injury workup. *West J Emerg Med.* 2018;19(4):635-640. doi:10.5811/westjem.2018.5.37293

#### For In Vitro Diagnostic Use.

Any photos displayed are for illustrative purposes only. Any person depicted in such photos is a model. Alinity i TBI and Alinity are trademarks of Abbott. © Abbott Laboratories. ADD-138976-EMEA-EN 4/22



# ABL800 FLEX GIVE YOUR BLOOD GAS TESTING A **PLUS**



  
**THE PLUS  
VERSION**

PROVEN PERFORMANCE



IMPROVED USER INTERACTION

**PULMODATA**  
*Profesionalna medicinska oprema*



Laboratorijski informacijski sistem

# VODILNI SISTEM SLOVENSКИH MEDICINSКИH LABORATORIJEV

- Čakalni sistem za laboratorije
- POCT način povezave analizatorjev
- Avtovalidacija
- Povezava dislociranih ambulant/analizatorjev z možnostjo avtomatskega potrjevanja rezultatov (NMP, MD, antikoag./diabetična amb.)
- Elektronski podpis ob potrjevanju na vodji in hramba naročil v e-arhivu
- Sprejem PDF izvidov iz zunanjih laboratorijev (izvajalcev)



## **Fin-Pro d.o.o.**

Stegne 35  
SI-1000 Ljubljana

**T:** +386 1 518 8080

**F:** +386 1 518 8090

[info@labis.si](mailto:info@labis.si)

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



ISO 9001  
Q-715

# 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

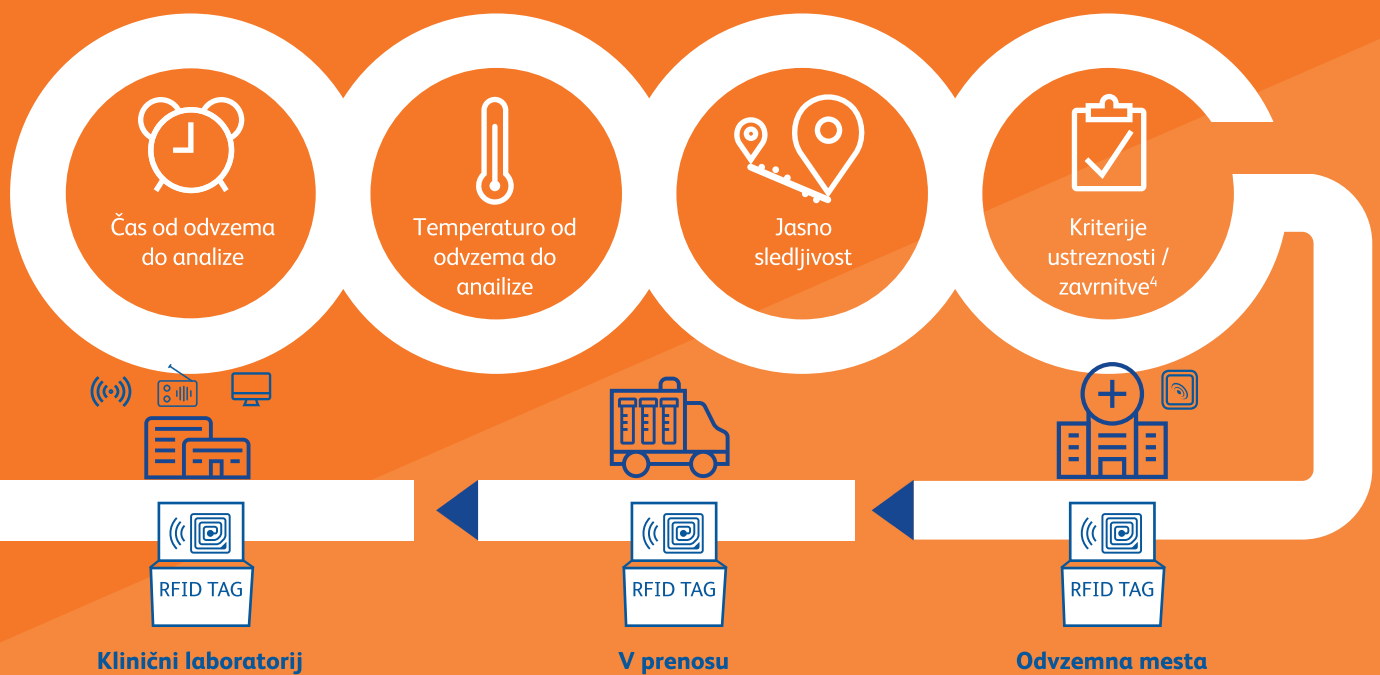
**53.2%**

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



**BD**

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. MILO 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/ccim-2014-1051.



# Celovite laboratorijske rešitve po vaši meri



## Hematologija



XN-550



XN-1000



XN-3100

## Diagnostika urinov



UD-10 & UF-4000 & UC3500

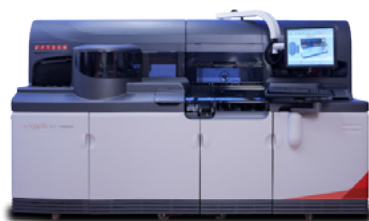
## Ortho Clinical Diagnostics

Because Every Test Is A Life™

## Biokemija, imunologija



Vitros XT-3400



Vitros XT-7600

## Techno Medica

## Plinska analiza



Gastat 700



RR Mechatronics  
Masters of Measurement

## ESR – Westergren metoda



Starrsed ST



Starrsed RT



## Imunologija

166 parametrov



Maglumi X3



Maglumi X8

## CELLAVISION

RAL Diagnostics

## Priprava krvnih razmazov



RAL Stainer



RAL Stainbox

## CELLAVISION

## Digitalna morfologija



CellaVision DI-60



CellaVision DM-1200



CellaVision DC-1



Meditrade d.o.o.

Brnčičeva 17B  
SI-1231 Ljubljana Črnuče

t: +386 1 5854 600  
f: +386 1 5445 401

info@meditrade.si  
www.meditrade.si

# Small details tell a big story

The search for a solution to some of health's greatest challenges starts with, and depends on, diagnostics.

Diagnostics help us to better understand the small things happening in our bodies.

At Roche, we are committed to not only advancing diagnostic solutions that can support healthcare professionals in making critical decisions for their patients' health, but also improving the way these essential tools are integrated into health systems around the world, at a lower cost, while still achieving the best possible outcomes.

**Let's work together to make  
a difference for patients.**



Visit  
**[diagnostics.roche.com](https://diagnostics.roche.com)**  
to learn more.

Roche farmacevtska družba d.o.o.,  
Stegne 13g, 1000 Ljubljana, Slovenia  
[slovenia.diagnostics@roche.com](mailto:slovenia.diagnostics@roche.com)





ISSN 2670-4463



9 772670 446006

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