



LABORATORIJSKA MEDICINA

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

02
MAJ 2020



SZK&NLM

Glavni in odgovorni urednik:

Blaž Krhin

Uredniški odbor:

Pika Meško Brguljan, Evgenija Homšak,
Saša Bratož, Elizabeta Božnar Alič

Lektoriranje:

Janja Korošec

Oblikovanje in tisk:

Publik Market

Naklada:

500 izvodov

ISSN 2670-4463

Izhaja enkrat letno

Izdajatelj:

Slovensko združenje za
klinično kemijo in laboratorijsko medicino

Naslov uredništva:

Dunajska cesta 22
1000 Ljubljana, Slovenija

T: +386 599 76089

F: +386 1 2321331

E: info@szkklm.si

W: www.szkklm.si

Uvodnik

Spoštovane kolegice in kolegi, spoštovani bralec,

pred vami je druga številka LABORATORIJSKE MEDICINE (LM), znanstvene strokovne revije Slovenskega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino.

Tokratna številka obravnava področja laboratorijske medicine, ki so bile predstavljena tudi na strokovnih srečanjih društva v letu 2019: Izzivi na področju laboratorijske medicine v SB Jesenice, Biološka variabilnost in nekatere druge aktualne teme s področja laboratorijske medicine, Obravnava bolnikov z rakom na sistemskem zdravljenju in z zmanjšanim delovanjem ledvic in Bolniku prilagojena laboratorijska medicina. V okviru posamezne teme so nam avtorji pripravili pregled aktualne problematike, novosti ter vizijo. V drugo številko revije smo vključili dodatno poglavje s prispevki predavateljev na 8. Mednarodni konferenci medicinskih laboratorijev – Teorija in praksa v vodenju notranje kontrole kakovosti, ki smo jo organizirali 15. 10. 2019 v Ljubljani.

Druga številka LM izhaja v času pandemije COVID-19, ki je v veliki meri vplivala tudi na laboratorijsko medicino. Spremenil se je način našega rutinskega dela, v večji ali manjši meri je okrnjeno naše znanstveno raziskovalno delo. Okrnjena je tudi možnost izobraževanja, saj so bila odpovedana številna strokovna srečanja in izobraževanja, tako tudi največji znanstveno strokovni dogodek, ki ga organizira naše društvo, 6. Slovenski kongres klinične kemije in laboratorijske medicine. Poleg navedenih negativnih učinkov pa nam je pandemija omogočila možnost postanka ter vpogleda vase. Omogočila nam je možnost pregleda doseženega ter izdelave planov in vizij za prihodnost, tako na osebni ravni kot tudi na ravni naše stroke. Verjetno bo trenutna situacija od nas zahtevala dodatne prilagoditve in spremembe načina in organizacije dela, načina izobraževanja in verjetno še kakšne dodatne prilagoditve. Ne dvomim, da bomo trenutnim izzivom kos, saj smo (so) to v naši stroki dokazali že v preteklosti.

Želim vam zanimivo in prijetno prebiranje druge številke revije LABORATORIJSKA MEDICINA.

*Blaž Krhin
Glavni in odgovorni urednik*

Kazalo

Izzivi na področju laboratorijske medicine v Splošni bolnišnici Jesenice	7
Janez Poklukar Predstavitel Splošne bolnišnice Jesenice	8
Ivica Avberšek-Lužnik Tehnološki in strokovni mejniki v delovanju Oddelka za laboratorijsko diagnostiko v Splošni bolnišnici Jesenice	10
Martina Pogačar Kavčič Molekularno ozadje in diagnostična uporabnost kalprotektina pri kronični vnetni črevesni bolezni	12
Drago Arzenšek, Ivica Avberšek-Lužnik Diagnostična uporabnost ELF testa pri pacientih z okvaro jeter nealkoholnega izvora	14
Petra Rupar, Ivica Avberšek-Lužnik Diagnostična uporabnost proteina ST00B V Urgentnem centru Splošne bolnišnice Jesenice	16
Lenka Gašperlin Določanje natriuretičnih peptidov v plazmi bolnikov s srčnim popuščanjem	18
Lenka Gašperlin, Karmen Janša, Ivica Avberšek-Lužnik Določanje plazemske aktivnosti anti Xa pri zdravljenju z nizkomolekularnimi heparini v Splošni bolnišnici Jesenice	20
Frenk Valjavec Laktatna acidoza	22
Meta Zupančič Validacija metode za določanje globulina GC v serumu in njegov pomen pri bolnikih s sepsa	25
Staša Pečlin Vstavev gena v plazmidni vektor in produkcija nanoteles, specifičnih za proteine glioblastoma	28
Meta Zupančič, Darko Černe Znotrajcelični renin angiotenzinski sistem	32
Tomaž Polak, Mateja Lušnic Polak, Lea Demšar, Lenka Gašperlin, Ivica Avberšek-Lužnik Uporabnost laboratorijske diagnostike pri napovedovanju glikemičnega indeksa po zaužitju s prehransko vlaknino obogatenega zajtrka	36
Biološka variabilnost in nekatere druge aktualne teme s področja laboratorijske medicine	39
Eva Fliser EUBIVAS: spremembe, ki jih lahko pričakujemo v medicinskih laboratorijih	40
Evgenija Homšak Vpliv biološke variabilnosti na laboratorijsko diagnostiko avtoimunskih bolezni	44
Aleš Goropevšek Podvrste limfocitov v periferni krvi in punktatih bezgavk pri različnih starostih	50
Evgenija Modrič Določanje prostih lahkih verig imunoglobulinov v likvorju	52
Maksimiljan Gorenjak Optimizacija/racionalizacija naročanja laboratorijskih preiskav	54
Obravnavanje bolnikov z rakom na sistemskem zdravljenju in z zmanjšanim delovanjem ledvic	57
Barbara Možina Uporaba enačbe »New model« za oceno glomerulne filtracije pri bolnikih z rakom	58
Samo Rožman Protitrombotično zdravljenje ob sistemskem onkološkem zdravljenju – pogled farmacevta	60





Bolniku prilagojena laboratorijska medicina 65

Darko Černe	
Tekoča biopsija v bolniku prilagojeni laboratorijski medicini	66
Janja Marc	
Bolniki z osteoporozo in mikrohranila	68
Nika Lovšin	
Zakaj imajo moški trdnjše kosti – vpliv izražanja RANKL	72
Nataša Karas Kuželički, Irena Prodan Žitnik	
Farmakogenetika v izobraževanju po svetu	74
Alenka Šmid, Irena Mlinarič-Raščan	
Bolniku prilagojena laboratorijska medicina pri zdravljenju vnetnih črevesnih bolezni s tiopurini	80
Helena Podgornik	
Od kromosomov h genom in nazaj – zgodba kronične limfocitne levkemije	84
Mojca Božič Mijovski	
Bolniku prilagojena laboratorijska medicina na področju hemostaze – prikaz primera	86
Barbka Repič Lampret	
Bolniku prilagojena laboratorijska medicina pri vrojenih motnjah presnove – prikaz primera	88

8. Mednarodna konferenca o kakovosti medicinskih laboratorijev - Teorija in praksa v vodenju notranje kontrole kakovosti 93

Pika Meško Brguljan	
Kontrola kakovosti in varnost pacientov – zahteve standarda in referenčni dokumenti	94
Sverre Sandberg	
Performance Specifications in Laboratory Medicine	97
Katarina Klešnik, Saša Bratož, Pika Meško Brguljan	
Anketa o izvajanju notranje kontrole kakovosti	99
Rok Kogovšek, Marsel Bratuša, Pika Meško Brguljan	
Izkušnje vodenja notranje kontrole kakovosti iz prakse – Klinika Golnik	105
Kristina Kumer, Marjana Prah Krumpak, Saša Bratož	
Izkušnje vodenja notranje kontrole kakovosti iz prakse – KIKKB, UKC LJ	107
Aleš Jerin, Flávia Martinello, Milan Skitek	
Uporaba lastnih ciljnih vrednosti pri notranji kontroli kakovosti	111
Sverre Sandberg	
Quality control and analytical performance specifications for POCT	113
Barbka Repič Lampret, Maruša Debeljak	
Pomen notranje in zunanje kontrole kakovosti pri metodah masne spektrometrije in metodah molekularne genetike	114

01

Izzivi na
področju
laboratorijske
medicine
v Splošni
bolnišnici
Jesenice

Predstavitev Splošne bolnišnice Jesenice

Janez Poklukar

Splošna bolnišnica Jesenice, Jesenice, Slovenija

USTANOVITEV BOLNIŠNICE IN RAZVOJ DEJAVNOSTI

Splošna bolnišnica Jesenice je bila v starem železarskem mestu Jesenice ustanovljena 11. aprila 1948. Ob ustanovitvi je vključevala samo kirurški in interni oddelek, v sklopu katerega je deloval tudi priročni laboratorij. Leta 1949 je bil ustanovljen še ginekološki, leta 1959 pa tudi otroški oddelek in kasneje po letu 1979 zgrajen še prizidek s polikliniko. Ustanovitev bolnišnice je bila povezana s potrebami železarske industrije, ki ima v zgodovini Slovenije nadaljšo tradicijo ravno na Jesenicah. V prvih desetletjih po ustanovitvi se je bolnišnica soočala s pomanjkanjem osebja, še posebej medicinskih sester. Prva medicinska sestra, ki je delovala na območju Jesenic, je bila Angela Boškin. Rojena je bila v Pevmi pri Gorici. Bila je prva šolana medicinska sestra, ki se je za ta poklic izobraževala na Duna-

ju. Na Jesenice je bila premeščena z državnim dekretom. Delovala je kot skrbstvena medicinska sestra na področju javnega zdravja in tako prispevala k zdravstvenemu ozaveščanju zaposlenih železarjev in njihovih družinskih članov. Za reševanje kadrovskega primanjkljaja v bolnišnici je bila leta 1962 pomembna ustanovitev srednje Zdravstvene šole na Jesenicah in leta 2007 ustanovitev Visoke šole za zdravstvo, ki je zaradi vertikalnega preoblikovanja izobraževalnih programov pridobila naziv fakultete in novo ime Fakulteta za zdravstvo Angele Boškin. Bolnišnična dejavnost se je vsa leta do danes strokovno in tehnološko nadgrajevala, večale so se kadrovske in prostorske zmogljivosti. Uspešno je bila zaključena večina zastavljenih projektov na posameznih oddelkih.

KADROVSKA STRUKTURA V SPLOŠNI BOLNIŠNICI JESENICE

Ob koncu leta 2017 je bilo v bolnišnici zaposlenih 686 delavcev, od tega 135 zdravnikov, 359 medicinskih sester ter 54 zdravstvenih delavcev v lekarni, laboratoriju in drugih manjših enotah. Ostalih 138 delavcev predstavlja nezdravstveno osebje. V bolnišnični dejavnosti smo leta 2017 obravnavali 14012 primerov, 3292 primerov v prospektivi, 855 porodov in v specialistični ambulantni dejavnosti 114381

pregledov. Da je bil opravljen tako velik obseg dela, so bile potrebne neprekinjene organizacijske spremembe ter pridobivanje sredstev za nove in razširjene medicinske programe. V strategiji bolnišnice sta bila in sta še danes na prvem mestu kakovostna zdravstvena obravnava pacientov in dobro sodelovanje med posameznimi profesionalnimi skupinami zaposlenih.

SISTEM KAKOVOSTI V SPLOŠNI BOLNIŠNICI JESENICE

V bolnišnici smo načrtno začeli vzpostavljati sistem kakovosti leta 2008. Sledili smo in še danes sledimo mednarodnim standardom varne obravnave pacientov. Leta 2009 smo prejeli prvi certifikat ISO, leta 2011 pa kot prva slo-

venska bolnišnica certifikat DNV-NIAHO za zdravstveno dejavnost na sekundarni ravni. Od 2011 dalje poteka jo procesi zdravljenja v luči prepoznavanja kritičnih točk in uvajanja ukrepov za nenehno izboljševanje zdravstvene

prakse. Prepoznali smo ključne komponente sistemov kakovosti, ki temeljijo na timskem delu in dobri medsebojni komunikaciji. Tako smo do leta 2017 uspešno prestali dve certifikacijski presoji po standardu ISO 9001 ter leta 2014 reakreditacijsko presojo po standardu DIAS. V letu 2017 smo pridobili še ACCI – American Accreditation Co-

mission International certifikat za standardizirano izvajanje zdravstvenega procesa v bolnišnici. Zaposleni v različnih dejavnostih bolnišnice podpirajo sisteme kakovosti in aktivno prispevajo k razvoju višje kulture varnosti pri zdravstveni obravnavi pacientov.

LITERATURA

1. Strokovno poročilo Splošne bolnišnice Jesenice za leto 2017. Leto izdaje: 2018 Tisk: Medium d. o. o. Naklada: 50 izvodov ISSN: 2335-4186 © Splošna bolnišnica Jesenice.
2. Zbornik ob 70-letnici Splošne bolnišnice Jesenice . Glavna urednica: Petra Rupar. Izdala in založila: Splošna bolnišnica Jesenice, Cesta maršala Tita 112, Jesenice. Odgovorna oseba izdajatelja: Janez Poklukar www.sb-jc.si spletna izdaja: pdf Jesenice, april 2018

Tehnološki in strokovni mejniki v delovanju Oddelka za laboratorijsko diagnostiko v Splošni bolnišnici Jesenice

Ivica Avberšek-Lužnik

Splošna bolnišnica Jesenice, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Jesenice, Slovenija

RAZVOJ LABORATORIJSKE DEJAVNOSTI

V Splošni bolnišnici Jesenice se je zgodovina razvoja laboratorijske dejavnosti začela leta 1948. V prvih petnajstih letih je bil laboratorij umeščen v sklop internega oddelka in je imel zaposleno eno laboratorijsko delavko, ki je z usmerjenimi izobraževanji ob delu po desetih letih pridobila naziv laboratorijske inženirke. Pri enostavnih analizah urina in štetju krvnih celic so ji pomagale priučene bolničarke. Leta 1963 je laboratorij postal samostojna enota in je po takra-

tni kategorizaciji spadal med kliničnokemične laboratorije III. stopnje. Vodila ga je specialistka medicinske biokemije, mag. Stanislava Černe, ki je leta 1980 poskrbela za zaposlitev laboratorijsko izobraženega osebja, za nabavo prve generacije laboratorijskih avtomatov in za preselitev laboratorija v nove prostore. Laboratorij je z novo avtomatizacijo postal uporabna podpora diagnostičnim procesom pri obravnavi pacientov.

PRELOMNICE V LABORATORIJSKI DEJAVNOSTI

V laboratorijski dejavnosti Splošne bolnišnice Jesenice predstavlja leto 1995 enega najpomembnejših mejnikov zaradi implementacije bolnišničnega in laboratorijskega informacijskega sistema. Vodenje laboratorija je zaradi upokojitve mag. Stanislave Černe prevzela mag. Ivica Avberšek-Lužnik, ki je leta 2004 zagovarjala doktorsko disertacijo z naslovom »Vloga, pomen in diagnostična uporabnost osteoprotegerina pri ledvični osteodistrofiji«. Od leta 1995 dalje je kot specialistka medicinske biokemije skrbela za tehnološki, strokovni in raziskovalni potencial laboratorijske dejavnosti. Laboratorij je leta 2009 uspešno opravil prvi nadzor nad izvajanjem laboratorijskega procesa po Pravilniku (1) in pridobil prvo dovoljenje za delo na področju laboratorijske medicine. Leta 2015 je sledil drugi nadzor in podaljšanje licence za delo laboratorija do leta 2020. Leto 2018 je

bilo za laboratorijsko osebje leto največjih sprememb. Povezane so bile z odhodom dveh izkušenih laboratorijskih tehnikov in istočasnim odhodom ene specialistke medicinske biokemije. Zaradi velikega porasta števila laboratorijskih preiskav je sledila zaposlitev štirih analitikov laboratorijske medicine, med katerimi eden nadaljuje usposabljanje na področju specializacije iz medicinske biokemije. Na tehnološkem področju pa je laboratorij pridobil integrirano hematološko in urinsko linijo Sysmex ter robotiko Siemens, ki upravlja dva biokemična analizatorja.

LABORATORIJSKE PREISKAVE

Število opravljenih preiskav že vsa leta spremlja trend naraščanja. Statistika izdanih rezultatov je vodena od leta 2002 dalje, na način s podpreiskavami, ki omogoča sledljiv postopek spremljanja trendov in ukrepov za obvladovanje laboratorijskih naročil. Iz letnih statističnih poročil je razvidno, da je bilo število preiskav razmeroma dobro obvladovano od leta 2002 do leta 2008, v letu 2009 pa se je povečalo število zdravnikov, zaradi česar se je povečalo tudi število naročenih preiskav. Strokovno vodstvo la-

boratorija od leta 2002 dalje s priporočili skrbi za selektivnost naročanja preiskav (2) in aktivno deluje v naslednjih projektnih skupinah ter komisijah:

1. projektna skupina za predanalizno fazo,
2. komisija za laboratorijske preiskave,
3. komisija za POCT,
4. raziskovalna dejavnost.

STRATEGIJA IN VIZIJA PRIHODNOSTI

Laboratorij ima strateški načrt razvoja laboratorijske dejavnosti za vsako petletno obdobje (3). Za obdobje od 2018 do 2022 so v strategijo vključene tri kategorije razvoja:

1. konsolidacija laboratorijske avtomatizacije in procesov,
2. ekonomska učinkovitost in razvoj kadrov,
3. integracija sistemov POCT in LIS.
4. Izdelan je akcijski načrt z analizo dejanskega stanja v

letu 2018, z načrtom za obnavljanje kadrovskih, prostorskih, informacijskih in ekonomskih virov za delovanje in razvoj laboratorija v Splošni bolnišnici Jesenice in v regijskem prostoru. Določena je časovnica realizacije posameznih aktivnosti. Vizija laboratorijske dejavnosti pa sledi normativom, ki so za laboratorijsko medicino izdelani na državni ravni.

LITERATURA

1. Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za dovoljenje za delo (Ur. list 64/04) in Spremembe Pravilnika (Ur.l./16).
2. Avberšek Lužnik, I., Gartner, M.D. & Arzenšek, D. *Laboratorijski vodnik Splošne bolnišnice Jesenice*, Splošna bolnišnica Jesenice, 2016.
3. Development of National Health Laboratory Policy and Plan, WHO Document 201

Molekularno ozadje in diagnostična uporabnost kalprotektina pri kronični vnetni črevesni bolezni

Martina Pogačar Kavčič

Splošna bolnišnica Jesenice, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Jesenice, Slovenija

UVOD

Kalprotektin je heterodimerni protein in občutljiv biološki označevalec vnetja črevesne sluznice. Nastaja v citoplazmi nevtrofilnih granulocitov, monocitov in makrofagov. Aktivno vnetje povzroči prehod fagocitov preko sluznice črevesne stene v lumen črevesja. Povečana koncentracija fekalnega kalprotektina dobro odraža aktivnost vnetja črevesne sluznice. Kalprotektin se je najprej uporabljal za razlikovanje med kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB) in sindromom razdražljivega črevesja (IBS). Danes se uporablja tudi za spremljanje pacientov s KVČB (1, 2).

IBS je najpogostejša funkcionalna bolezen prebavil, pri kateri ne zaznamo strukturnih nenormalnosti. Pri IBS se kalprotektin ne izloča (2). KVČB je skupina kroničnih vnetnih bolezni, ki prizadenejo prebavni trakt, predvsem črevesje. Glavni podskupini sta Chronova bolezen in ulcerozni kolitis. Običajno poteka vse življenje z akutnimi zagoni ter vmesnimi krajšimi ali daljšimi remisijami. Chronova bolezen in ulcerozni kolitis se razlikujeta v številnih kliničnih znakih, različni odzivnosti na zdravila in različnih serumskih označevalcih. Diagnostika KVČB temelji na kliničnih znakih in simptomih, diagnosticiranje pa poteka s pomočjo endoskopskih, rentgenskih in laboratorijskih preiskav (1, 2).

METODE

Najbolj uveljavljena metoda za določanje kalprotektina v blatu je encimska imunokemijska metoda z monoklonskimi ali poliklonskimi protitelesi (ELISA). Nova generacija testov temelji na imunokromatografskem testnem principu, po reakciji pa nastali signal odčitamo s čitalcem. Hitri testi za odkrivanje kalprotektina predstavljajo razmeroma zanesljivo nadomestilo ELISA testom. Na trgu so na razpolago različni hitri testi. Merilniki zanje niso standardizirani, ker za ekstrakcijo uporabljajo različne puferne raztopine, zaradi česar lahko pride tudi do petkratnih razlik

v izmerjenih koncentracijah kalprotektina. Za primerljivo in sledljivo oceno stanja črevesne bolezni je priporočena uporaba le ene metode za določanje kalprotektina (1, 2, 3). Za njegovo določitev je najprimernejši vzorec prvega jutranjega odvajanja blata, ki ga do analize hranimo na 2–8 °C, največ do 7 dni (3).

REZULTATI IN RAZPRAVA

V našem laboratoriju smo z določanjem kalprotektina začeli konec leta 2013. Na začetku smo imeli na mesec do 10 vzorcev, nato se je pogostost naročanja večala, vzporedno je naraščala tudi klinična uporabnost tega biološkega označevalca. V letu 2019 opravimo približno 50 meritev kalprotektina mesečno. Koncentracije kalprotektina, ki so nižje od 50 µg/g blata, so zanesljiv kazalec zaceljene sluznice črevesa in imajo visoko negativno napovedno vrednost za izključitev KVČB.

Kalprotektin odlično razmejuje KVČB od IBS in s tem zmanjša potrebo po uporabi invazivne diagnostike. IBS ima namreč velikokrat podobne simptome kot KVČB, vendar brez strukturnih nenormalnosti. Kalprotektin je uporaben biološki označevalec za odkrivanje neaktivne oziroma aktivne faze KVČB, ki omogoča pravočasno prilagoditev zdravljenja. Zaradi dobre korelacije z endoskopskimi in histološkimi izsledki so koncentracije kalprotektina zelo uporabne za spremljanje bolnikov s KVČB.

ZAKLJUČEK

Koncentracija kalprotektina <50µg/g ima visoko negativno napovedno vrednost in tako izključi KVČB kot razlog za GIT simptome. Dobro tudi korelira z aktivnostjo vnetja debelega črevesja pri UK in CB. Vrednost <50µg/g je zanesljiv

kazalec zaceljene sluznice črevesja. Povišane vrednosti pri bolnikih v stanju remisije pa napovedujejo povečano tveganje za klinično ponovitev bolezni znotraj šestih mesecev.

LITERATURA

1. Krmpotić I. Primerjava hitrega imunokemijskega testa z elisa testom za določitev kalprotektina v blatu. Diplomsko delo; Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor 2012.
2. Kurent T, Drobne D. Pomen fekalnega kalprotektina pri kronični vnetni črevesni bolezni. Gastroenterolog 2015; 1: 17–24.
3. Avberšek-Lužnik I., Božnar Alič E. Zbornik predavanj. Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino, maj 2017.

Diagnostična uporabnost ELF testa pri pacientih z okvaro jeter nealkoholnega izvora

Drago Arzenšek ¹, Ivica Avberšek-Lužnik ²

¹Siemens Healthcare Slovenia

²Splošna bolnišnica Jesenice, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Jesenice, Slovenija

UVOD

ELF test (angl. enhanced liver fibrosis) je novejši, neinvazivni test za oceno zamaščenosti jeter alkoholnega in/ali nealkoholnega izvora. Test vključuje tri kazalce: hialuronsko

kislino (HA), amino-terminalni del prokolagena tipa III (PIIINP) in prokolagena tipa II (PIINP) ter tkivni zaviralec metaloproteinaze-1 TIMP-1. HA, PIINP in PIIINP so

označevalci nastajanja depozitov matriksa – fibrogeneze, TIMP-1 pa odseva razgradnjo matriksa – fibrolizo. Stopnja ELF je numerična vrednost, ki jo izračunamo z enačbo:

$$\text{ELF} = 2,278 + 0,851 \ln(c_{\text{HA}}) + 0,735 \ln(c_{\text{PIIINP}}) + 0,394 \ln(c_{\text{TIMP-1}})$$

Rezultati ELF testa, ki so enaki ali nižji od 7,7, pomenijo, da okvare jeter ni, vrednosti ELF v intervalu od 7,7 do 9,8 kažejo zmerno fibrozo oz. zamaščenost jeter, vrednosti ELF nad 9,8 pa kažejo resno poškodbo jeter.

Okvara jeter nealkoholnega izvora (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease – NAFLD) je prekomerno kopičenje maščobe v jetrih, pogosto povezano z odpornostjo na inzulin in steatozo. Diagnoza NAFLD je histološko potrjena takrat, ko je prizadetih več kot 5 % hepatocitov. Ločimo dve obliki NAFLD: nealkoholna zamaščenost jeter (izključen mora biti vnos alkohola več kot 30 g na dan za moške in več kot 20 g na dan za ženske) in nealkoholni steatohepatitis. Inci-

denca NAFLD je v zadnjem desetletju na zahodu med 17 in 46 % odrasle populacije, odkrijemo pa jo tudi pri otrocih. Za Slovenijo natančnih podatkov nimamo. Pomembno je, da NAFLD dovolj zgodaj odkrijemo pri ogroženi populaciji, in da za odkrivanje uporabimo dovolj zanesljive diagnostične teste ter enotne farmakološke pristope. Za NAFLD je namreč značilno, da so aktivnosti jetrnih encimov večina v normalnih referenčnih območjih tudi v času, ko je bolezen že v razviti obliki z blagim in/ali intenzivnim vnetnim procesom v jetrnem tkivu (1).

Ker je NAFLD pogosta pri sladkorni bolezni tipa 1 in 2, smo opravili meritve ELF pri 27 preiskovancih s sladkorno boleznijo tipa 2 ter rezultate primerjali z že uveljavljenimi jetrnimi indeksi FIB in APRI.

PREISKOVANCI IN METODE

V prospektivno študijo smo vključili 49 preiskovancev: 27 pacientov s sladkorno boleznijo tipa 2, 10 preiskovancev kontrolne skupine in 12 preiskovancev z diagnozo alkoholizem. V vzorcih odvzete venske krvi smo opravili meritve trombocitov (Tr), aspartat-aminotransferaze (AST), alanin-aminotransferaze (ALT) in gama-glutamilne transferaze (GGT). Pri preiskovancih vseh treh skupin smo izmerili parametre ELF testa ter po algoritmu izračunali ELF

indekse. Vzporedno smo izračunali še dva indeksa za oceno fibroze: APRI (Petersen, et al., 2014) in FIB-4 indeks (Trang, et al., 2008). Pri izračunu APRI indeksa smo uporabili število trombocitov ter AST in ALT vrednosti posameznega pacienta, pri izračunu FIB-4 indeksa pa ALT, AST in GGT. Statistično obdelavo smo izvedli s programom SPSS 21.0 za Windows okolje (SPSS, Inc. Chicago, USA).

REZULTATI

Rezultati meritev so pokazali, da so AST, ALT in GGT pri skupini z diabetesom in pri kontrolni skupini znotraj referenčnega območja, pri skupini z alkoholizmom pa značilno višji ($p = 0,001$), enako velja tudi za ELF, APRI in FIB-4 ($p < 0,002$). Z ELF testom smo v skupini diabetikov doka-

zali hudo stopnjo fibroze pri dveh preiskovancih, z APRI in FIB-4 indeksom pa ne. Pri skupini odvisnikov od alkohola je ELF pokazal hudo fibrozo pri 6 pacientih, FIB-4 indeks samo pri dveh, APRI pa pri nobenem.

RAZPRAVA IN ZAKLJUČEK

ELF test je v tujini diagnostično uporaben za odkrivanje in spremljanje zamaščenosti jeter pri NAFLD in je bolj občutljiv kot APRI in FIB-4 indeksa. ELF test je naveden med testi za odkrivanje in spremljanje NAFLD v smernicah, ki

jih je leta 2016 izdal National Institute of Health and Care Excellence (2). Menimo, da bi bilo treba začeti uporabljati ELF test tudi v Sloveniji, še posebej na ravni presejanja tiste populacije, ki jo ogroža razvoj zamaščenosti jeter.

LITERATURA

1. Leoni, S., Tovoli, F., Napoli, L., Serio, I., Ferri, S. & Bolondi, L., 2018. Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis. *World J Gastroenterol*, 24(30), pp. 3361-73.
2. National Institute for Health and Care Excellence. Non alcoholic fatty liver disease guidelines: assessment and management NICE 2016 : nice.org.uk/guidance/ng49

Diagnostična uporabnost proteina S100B V Urgentnem centru Splošne bolnišnice Jesenice

Petra Rupar¹, Ivica Avberšek-Lužnik²

¹Splošna bolnišnica Jesenice, Oddelek za kirurgijo, Jesenice, Slovenija

²Splošna bolnišnica Jesenice, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Jesenice, Slovenija

UVOD

Po kemični strukturi spada protein S100B v družino proteinov S100. Po stari klasifikaciji je S100B strukturna podenota proteinov iz družine S100, ki so jo prvič našli v možganih, kasneje pa tudi v maščobnem tkivu, koži, želodcu, trebušni slinavki, rektumu in v manjšem deležu tudi v drugih tkivih in organih. V beli možganovini so koncentracije S100B višje kot v sivi. Koncentracije S100B so večje v malih možganih in v vratnem delu hrbtenjače kot v velikih možganih. Molekulske podenote S100B so prisotne v malignem tkivu, na primer pri melanomu, gliomu, pri karcinomu ščitnice in ledvic (1).

Funkcija S100B je dvojna, stimulira rast živcev in deluje nevrotrofično in nevrotoksično. Nedavno so dokazali, da je S100B označevalec hude, srednje težke in blage poškodbe možganov, označevalec subarahnoidalne krvavitve, tromboembolične kapi, cerebralne ishemije ter nevrodegenerativnih in psihiatričnih motenj. Pri poškodbah možganov prehaja iz glialnih in Schwannovih celic v intracerebral-

ni prostor in preko možganske pregrade v krvni obtok. V obtoku je razpolovna doba tega proteina od 90 do 120 minut, iz obtoka pa se odstrani preko ledvic. V vzorcih krvi je stabilen do 24 ur pri hranjenju na sobni temperaturi (2).

Ker se S100B nahaja tudi v drugih tkivih, je nespecifičen kazalec poškodbe možganov, zvišan je tudi, če so poškodovane celice mišic, srca in ledvic. Pri obravnavi pacientov s poškodbami sam nevrološki pregled vključuje tudi računalniško tomografijo in radiološke preiskave, vendar le-te niso vedno na voljo, zato skandinavska priporočila za obravnavo poškodbe možganov dodajajo uporabo biološkega označevalca S100B (2).

Namen naše raziskave je predstaviti vlogo in koncentracije S100B pri pacientih, ki so bili v štirimesečnem časovnem intervalu obravnavani v Urgentnem centru Splošne bolnišnice Jesenice zaradi nezgodnih poškodb glave.

METODE

Uporabili smo retrospektivno metodo pregleda rezultatov določitev proteina S100B za časovni interval od decembra 2017 do februarja 2018. Iz laboratorijskega informacijskega sistema smo pridobili podatke o izmerjenih koncentracijah S100B pri pacientih, ki so bili po različnih poškodbah glave in telesa obravnavani v Urgentnem centru Splošne bolnišnice Jesenice. Koncentracije proteina S 100 B smo me-

rili z elektrokemiluminiscenčno metodo ECLIA na Roche avtomatu Cobas e411.

REZULTATI

Pregled rezultatov v laboratorijskem informacijskem sistemu je pokazal, da je bilo v štirimesečnem obdobju v Urgentnem centru Splošne bolnišnice Jesenice 76 pacientov, ki so jim zdravniki ob sprejemu naročili merjenje S100B v plazmi. Med 76 pacienti je bilo 41 moških in 35 žensk. Razdelitev po starosti je pokazala, da je bilo 29 pacientov starih

od 1 do 18 let in 47 odraslih. Zvišane koncentracije proteina S100B je imelo 43 pacientov, 33 pa normalne, to je pod 0,100 µg/L. Značilno višje vrednosti so imeli tudi pacienti, starejši od 65 let. Primerjava S100B z rezultati rentgenske diagnostike je bila narejena le pri nekaj primerih.

RAZPRAVA

Normalno območje referenčnih vrednosti za metodo Roche ECLIA S100B je od 0,000 do 0,100 µg/L. Vsi rezultati, ki so višji od 0,100 µg/L, so lahko povezani s potencialno poškodbo možganov, zato jih zdravniki urgentne medicine in nevrologi interpretirajo z visoko stopnjo resnosti. Naši preiskovanci so imeli vrednosti S100B v območju od 0,028 do 4,20 µg/L. V podobno zasnovani, vendar večji raziskavi, so Eric Peter Thelin in sodelavci (4) pri 417 preiskovanih (odrasli pacienti) izmerili primerljiv razpon vrednosti (0,026–1,40 µg/L). Calcagnile in sodelavci (3) so ugotovili, da so značilno višje vrednosti S100B pri pacientih, ki so starejši od 65 let, v primerjavi z mlajšimi. Raziskavo so

opravili na 621 pacientih z blago nezgodno poškodbo glave. Paciente so razdelili po starosti nad in pod 65 let ter po njihovi nagnjenosti k uživanju alkohola. Ugotovili so, da na koncentracije S100B ne vpliva značilno uživanje alkohola, ampak samo starost pacientov. Tudi mi smo pri naših preiskovancih, ki so starejši od 65 let, izmerili značilno višje vrednosti S100B.

Zaključujemo z dvema ugotovitvama: protein S100B je delno uporaben biološki označevalec pri urgentnih preiskavah, v klinično nejasnih primerih pa se lahko uporablja le v kombinaciji z rentgensko diagnostiko.

LITERATURA

1. Thelin, E.P., Nelson D.W. & Bellander, B.M., 2017. A review of the clinical utility of serum S100B protein levels in the assessment of traumatic brain injury. *Acta Neurochir*, 159, pp. 209-25.
2. Calcagnile, O., Anell, A. & Undén, J., 2016. The addition of S100B to guidelines for management of mild head injury is potentially cost saving. *BMC Neurol*, 16(200).
3. Calcagnile, O., Holmén, A., Chew, M. & Undén, J., 2013. S100B levels are affected by older age but not by alcohol intoxication following mild traumatic brain injury. *Scandinavian Journal of Trauma Resuscitation and Emergency Medicine*, 21(1), pp. 1-6.
4. Thelin, E.P., Jeppsson, E., Frostell, A., Svensson, M., Mondello, S., Bellander, B.M. & Nelson, D.W., 2016. Utility of neuron-specific enolase in traumatic brain injury; relations to S100B levels, outcome, and extracranial injury severity. *Critical Care*, 20(285), pp. 1-15.

Določanje natriuretičnih peptidov v plazmi bolnikov s srčnim popuščanjem

Lenka Gašperlin

Splošna bolnišnica Jesenice, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Jesenice, Slovenija

UVOD

Številne študije so že potrdile diagnostično in prognostično uporabnost natriuretičnih peptidov pri oceni funkcije miokarda. Ker se natriuretični peptidi sproščajo iz poškodovanega miokarda v krvni obtok in se prenašajo po krvi v različnih strukturnih oblikah, še vedno predstavljajo izziv

za raziskovanje na področju analiznih postopkov njihovega določanja. Namen naše raziskave je bil izmeriti plazemske koncentracije NT-proBNP z novejšim imunoanaliznim postopkom ECLIA_{Fab} in že uveljavljenim ECLIA_{Ru} pri bolnikih s simptomi srčnega popuščanja.

METODE

V raziskavo smo vključili 94 bolnikov, ki so bili zaradi simptomov srčnega popuščanja obravnavani v Urgentnem centru Splošne bolnišnice Jesenice v obdobju med 18. januarjem in 27. februarjem 2018. Bolnike smo razdelili po starosti v

tercilne skupine (bolniki do 50 let – I. tercil, od 50 do 75 let – II. tercil in nad 75 let – III. tercil). Vsem smo v plazemskih vzorcih določili NT-proBNP z novejšim imunoanaliznim postopkom ECLIA_{Fab}in že uveljavljenim ECLIA_{Ru}.

REZULTATI

Rezultati vseh parametrov so se porazdeljevali nenormalno, zato smo uporabili neparametrične statistične teste. Dokazali smo, da obstajajo značilne razlike pri koncentraciji kreatinina in vrednostih OGF med bolniki v tercilnih skupinah, najbolj patološke vrednosti so imeli bolniki v tretjem tercilu ($p < 0,001$). Tudi statistika rangov je pokazala naraščanje koncentracije kreatinina s starostjo in vzporedno padanje OGF. Razlike med bolniki v tercilnih skupinah v koncentraciji drugih biokemijskih parametrov niso bile statistično značilne ($p > 0,05$). Izmerjene koncentracije NT-proBNP z obema postopkoma so bile značilno višje kot koncentracije BNP. Mediane plazemskih koncentracij natriuretičnih peptidov pri 94 bolnikih so bile: ECLIA_{Fab} NT-proBNP 335 ng/L (35–44790 ng/L), ECLIA_{Ru} NT-proBNP 276 ng/L (5–35000 ng/L) in BNP 56 ng/L (0–4853 ng/L). Analizni postopek ECLIA_{Fab} v primerjavi s postopkom EC-

LIA_{Ru} daje značilno višje rezultate. Korelacijske analize so potrdile, da je povezava med izmerjenimi natriuretičnimi peptidi močna in statistično značilna: BNP in ECLIA_{Fab} NT-proBNP ($r_s = 0,962$, $p < 0,001$), BNP in ECLIA_{Ru} NT-proBNP ($r_s = 0,963$, $p < 0,001$), ECLIA_{Fab} NT-proBNP in ECLIA_{Ru} NT-proBNP ($r_s = 0,996$, $p < 0,001$). Za nadaljnjo analizo rezultatov smo uporabili mejne vrednosti natriuretičnih peptidov po smernicah ESC za izključitev akutnega oz. kroničnega popuščanja srčne mišice. Ugotovili smo, da je za izključitev akutnega kot tudi kroničnega srčnega popuščanja diagnostično uporabna kombinacija meritev plazemskih koncentracij NT-proBNP in BNP. Plazemske koncentracije NT-proBNP, izmerjene z ECLIA_{Ru} in ECLIA_{Fab}, so se značilno razlikovale med starostnimi skupinami bolnikov.

ZAKLJUČEK

Zaključek naše raziskave je, da novejši test ECLIA_{Fab} ne daje primerljivih rezultatov tistim, ki jih dobimo z uveljavljenim testom ECLIA_{Ru} pri bolnikih z morebitnim kroničnim oziroma akutnim srčnim popuščanjem. BNP in EC-

LIA_{Fab} NT-proBNP sta uporabna za izključitev srčnega popuščanja ob upoštevanju priporočenih mejnih vrednosti po smernicah ESC.

LITERATURA

1. Ponikowski P, Voors A, Anker D S, Bueno H, Cleland G F J, Coats J S A, Falk V, Gonzalez-Juanatey J R, Harjola V P, Jankowska A E, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis T J, Pieske B, Riley P J, Rosano M C G, Ruilope M L, Ruschitzka F, Rutten H F, van der Meer P, The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2016; 37: 2129-2200.
2. McMurray J J, Adamopoulos S, Anker S D, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez M A, Jaarsma T, Køber L, Lip G Y, Maggioni A P, Parkhomenko A, Pieske B M, Popescu B A, Rønnevik P K, Rutten F H, Schwitler J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade P T, Voors A A, Zannad F, Zeiher A, Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology: ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *Eur J Heart Fail*. 2012;14: 803-69.
3. Fuat A, Murphy J J, Hungin A P, Curry J, Mehrzad A A, Hetherington A, Johnston J I, Smellie W S, Duffy V, Cawley P: The diagnostic accuracy and utility of a B-type natriuretic peptide test in a community population of patients with suspected heart failure. *Br J Gen Pract*. 2006; 56: 327-333.
4. Semenov G Alexander, Katrukha G Alexey: Analytical issues with natriuretic peptides – has this been overly simplified?. *J Int Fed Clin Chem*. 2016; 27: 189-207.

Določanje plazemske aktivnosti anti Xa pri zdravljenju z nizkomolekularnimi heparini v Splošni bolnišnici Jesenice

Lenka Gašperlin, Karmen Janša, Ivica Avberšek-Lužnik

Splošna bolnišnica Jesenice, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Jesenice, Slovenija

UVOD

Nizkomolekularni heparin (NMH) se danes uporablja za preprečevanje in zdravljenje venske tromboze, pljučne embolije, arterijske tromboze in embolije ter akutnega koro-

narnega sindroma. Cilj naše raziskave je bila retrospektivna analiza rezultatov od 2011 do 2015. Namen raziskave je bil usmerjen v terapevtsko razširitev območja za anti Xa.

METODE

Uporabili smo retrospektivno metodo pregleda rezultatov anti Xa za časovni interval od 2011 do 2015 in od 2016 do 2018.

REZULTATI

Pregled rezultatov v informacijskem sistemu je pokazal, da je bilo v prvem časovnem intervalu opravljenih 529 meritev za 434 pacientov, ki so dobivali odmerke NMH, in za 95 pacientov, ki jih niso. V subterapevtskem območju je imelo vrednosti anti Xa 141 pacientov, v terapevtskem pa 105. Pri 94 pacientih so bile izmerjene vrednosti nad zgornjim referenčnim območjem. V drugem časovnem intervalu smo prešli na nov postopek določanja anti Xa. Opravljenih je

bilo 677 meritev za 379 pacientov, ki so dobivali odmerke NMH, in za 70 pacientov, ki jih niso. V subterapevtskem območju je imelo vrednosti anti Xa 338 pacientov, v terapevtskem pa 137. Pri 202 pacientih so bile izmerjene vrednosti nad zgornjim referenčnim območjem.

ZAKLJUČEK

Število meritev je bilo v letih od 2011 do 2013 razmeroma majhno, od 72 do 86, v letih 2014 in 2015 pa večje. Med letoma 2015 in 2016 je sledil večji porast določitev anti Xa, s 137 na 215 preiskav letno.

Za vsak preparat NMH je značilna specifična porazdelitev zdravila po telesu in tudi referenčno območje. Avtorji različnih raziskav so priporočili uporabo terapevtskih območij

za anti Xa, ki so jih določili po aplikaciji enoksaparina, dalteparina in tinzaparina zdravim prostovoljcem. Po aplikaciji enoksaparina v odmerkih 1 mg/kg telesne teže se priporoča referenčni interval od 0,6 do 1,0 U/mL, za odmerke 1,5 mg/kg pa interval nad 1,0 U/mL. Za aplikacijo dalteparina v odmerkih 200 U/kg je priporočljivi interval 0,8 do 1,6 U/mL ter po aplikaciji tinzaparina (150 U/kg) v območju od 0,70 do 0,90 U/mL.

LITERATURA

1. Egan G, Ensom M H H. Measuring anti-factor Xa activity to monitor low-molecular-weight heparin in obesity: a critical review. Bonen B, DE Moercosse P. How and when to monitor a patient treated with low molecular heparin. *Thromb Hemost* 2001; 27:519-522.
2. Egan G, Ensom M H H. Measuring Anti-Factor Xa Activity to Monitor Low-Molecular-Weight Heparin in Obesity: A Critical Review. *Can J Hosp Pharm* 2015; 68(1): 33-47.
3. Garcia D A, Baglin T P, Weitz J I, Meyer M S. Parenteral Anticoagulants. Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines, 9th ed 2012; 141: 24-43.
4. Hirsh J, Raschke R. Heparin and low-molecular weight heparin. The seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest* 2004; 126: 188-203.
5. Laposata M, Green K, Elizabeth M C V. College of American Pathologists Conference XXXI on Laboratory monitoring of anticoagulant therapy, the clinical use and laboratory monitoring of low-molecular weight heparin danoparoid, hirudin and related compounds and argatroban. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 799-807.

Laktatna acidoza

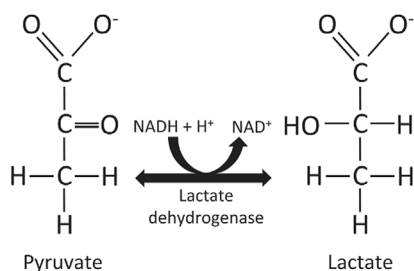
Frenk Valjavec

Splošna bolnišnica Jesenice, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Jesenice, Slovenija

UVOD

Laktat je končni produkt anaerobne presnove glukoze, ki nastaja tudi pri povsem normalnih fizioloških pogojih. Največ laktata nastane v skeletnih mišicah, možganih in krvnih celicah, v manjši meri pa v ledvicah, prebavnem traktu in koži. Ker eritrociti nimajo mitohondrijev, je nastanek laktata edini vir energije v obliki ATP. Vzrok povišane koncentracije laktata je lahko prekomerna sinteza ali zmanjšana presnova oziroma očistek laktata. Stanje hiperlaktatemije, ki nastane zaradi različnih vzrokov, je pogosto povezano s stanjem acidoze. Za normalno funkcijo in delovanje celice je ključna prisotnost kisika. Preprosta laboratorijska preiskava, ki omogoča oceno stanja prekrvitve in preskrbe tkiv s kisikom, je določanje laktata. Laktat je indikator lokalne ali sistemske ishemije, zato zdravniku omogoča v naboru različnih laboratorijskih preiskav določiti oceno stanja in ustreznost oziroma učinkovitost zdravljenja.

V anaerobnih pogojih v procesu glikolize iz piruvata nastane laktat. Laktat v obliki aniona nastane po disociaciji H^+ iona iz mlečne kisline, ki ima pK_a vrednost 3,8, kar pomeni popolno disociacijo pri fiziološkem pH (1, 2). Reakcijo pretvorbe piruvata v laktat katalizira laktat dehidrogenaza (LDH), ravnotežje reakcije je pomaknjeno v smeri nastanka laktata. V tej reakciji se sprosti (regenerira) NAD^+ , ki je akceptor elektronov in nujno potreben v procesu glikolize (1, 2).



Slika 1: Encimska pretvorba piruvata v laktat

Molekula laktata je lahko v dveh različnih izomerah:

- L-laktat nastane iz piruvata v citoplazmi celice po delovanju LDH. Predstavlja več kot 99 % vsega laktata, ki nastane v telesu.
- D-laktat proizvajajo določene bakterije, ki se nahajajo v prebavnem traktu.

Nastali laktat se v celici v aerobnih pogojih oksidira nazaj v piruvat in razgradi v procesu oksidativne fosforilacije (mitohondrij), ob presežku laktata in anaerobnih pogojih pa se laktat sprosti v krvni obtok in presnovi v jetrih (50–70 %) ter v ledvicah (30 %).

Laktat se iz celice in v celico transportira s procesom olajšane difuzije v smeri koncentracijskega gradienta preko nespecifičnih monokarboksiliranih transporterjev (MCT) (3), kar omogoča tudi energetsko potraten proces glukoneogeneze v jetrih. Izmenjavo laktata in glukoze med mišicami in jetri imenujemo Corijev cikel.

Hiperlaktatemija je patološko stanje, ki ga določa zvišana koncentracija laktata v krvi ob normalnem kislinno-bazičnem ravnovesju.

Hiperlaktatemijo delimo (2):

1. tip A = vzrok je zmanjšana prekrvitev tkiv ali zmanjšan transport kisika (šokovna stanja, hude anemije, zastrupitev s CO);
2. tip B = vzrok so različne bolezni (sladkorna bolezen, jetrne bolezni, ledvične bolezni, rakava obolenja), zdravila, prirojene motnje presnove.

Laktatna acidoza je najpogostejša oblika presnovne acidoze, za katero sta značilna povišana koncentracija laktata in znižan pH krvi pod 7,35 (2, 3). Tako kot diabetična in alkoholna ketoacidoza, je tudi laktatna acidoza povezana s povečanjem anionske vrzeli. Povečana anionska vrzel je posledica visoke koncentracije negativno nabitega aniona v plazmi, ki je v primeru laktatne acidoze molekula laktata. Zato je ključna laboratorijska preiskava za določitev kliničnega stanja plinska analiza krvi in določitev laktata.

V preteklosti je bila laktatna acidoza razložena na podlagi dejstva, da popolna disociacija protona iz mlečne kisline povzroči znižanje pH in povečano koncentracijo laktata. Torej je nastanek laktata vzrok za stanje acidoze. Danes pa je znano, da nastanek laktata zavira acidozo, ter da je acidoza posledica drugih reakcij in ne sinteze laktata (4). To potrди reakcija, ki jo katalizira LDH:



Tu pa se postavlja vprašanje, kaj je glavni vir presežka H^+ ionov, ki so vzrok nastali acidozi. Glavni izvor H^+ ionov sta (4):

- Glikoliza – proces glikolize v aerobnih in anaerobnih pogojih ne povzroči dodatnih H^+ ionov, razen kadar je zmogljivost mitohondrija presežena oziroma je zaradi anaerobnih razmer vstop H^+ ionov v mitohondrij prekinjen. Povečane potrebe celice po energiji zagotovi pospešena glikoliza, ki omogoča sintezo ATP. Presežek H^+ ionov nastaja iz koencima $\text{NADH} + \text{H}^+$, ki nastane pri glikolizi ter hidrolize ATP.



- Hidroliza ATP – pri hidrolizi molekule ATP, ki jo katalizira ATP-aza, se sprostí H^+ ion v okolico.



Zaradi različnih vzrokov nastanka hiperlaktatemije (zmanjšana prekrvitev tkiv, hipoksija, šokovna stanja, sepsa, zdravila, zastrupitve) povzročijo anaerobno stanje, zmanjša se vstop piruvata v mitohondrije, pride do zaviranja dihalne verige, kar vodi v povečano citosolno pretvorbo piruvata v laktat (5). Zaradi zmanjšane tvorbe energije preko mitohondrijev se hkrati poveča hidroliza energijsko bogatih molekul ATP, kar vodi v povečanje koncentracije H^+ ionov. Povečana koncentracija laktata in H^+ ionov vodi v pojav laktatne acidoze.

Tvorba laktata pri različnih patoloških stanjih ni vzrok za nastanek acidoze, pač pa celo deluje kot puferski sistem, ki acidozo preprečuje (4). Nastanek laktata je ključen:

- v reakciji z LDH za vsako molekulo piruvata, ki ga pretvori v laktat, veže H^+ ion;
- tvorba laktata omogoča nastanek (regeneracijo) NAD^+ , ki je nujen za potek glikolize in nastanek ATP;
- laktat preko MCT simporterja omogoča sočasno izločanje H^+ iz celice;
- laktat se uporabi za tvorbo energije drugih organov (srce, jetra, ledvica) in omogoča nastanek glukoze (Corijev cikel).

METODE

Laktatno acidozo spremlja značilna simptomatika, ki vključuje anoreksijo, slabost, bruhanje, tahikardijo, tahipnejo, epigastrično bolečino in mišične krče s prebavnimi motnjami. Ko se stanje slabša, simptomatika vključuje hipotenzijo, hipotermijo, aritmijo in odpoved dihanja. Diagnostični laboratorijski izvidi so znižana vrednost pH krvi,

znižana koncentracija HCO_3^- , hiperkaliemija, hiperkalcemija, koncentracija laktata v plazmi $> 5,0$ mmol/L, povečana anionska vrzel in povečano razmerje med laktatom in piruvatom (1, 2, 3).

ZAKLJUČEK

Meritev koncentracije laktata predstavlja dober posredni označevalec stanja celične presnove. Povišane koncentracije laktata so povezane s slabšim izidom bolezni oz. stanja, daljšim okrevanjem in povečano stopnjo smrtnosti kritično bolnih pacientov (5). Laktat tako predstavlja dober prognostični kazalec, kot tudi kazalec učinkovitosti zdravljenja.

Zelo pogosto je stanje hiperlaktatemije povezano z nastankom acidoze. Laktatna acidoza je najpogostejša presnovna acidoza, za katero je značilna povišana anionska vrzel. Povišana koncentracija laktata je posledica anaerobnih razmer v celici, acidoza pa povečane produkcije H^+ zaradi kopičenja $NADH+H^+$ in povečane hidrolize ATP.

LITERATURA

1. Cassaletto J. Differential diagnosis of metabolic acidosis. *Emerg Med Clin N Amer.* 2005; 23: 771-787.
2. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* (2th edition). 1994; 22: 975-979.
3. Michael H. Karagiannis, Alisa N. Reniker, Marie E. Kerl, F. A. Mann. Lactate measurement as an indicator of perfusion. 2006; 287-298.
4. Robert A. Robergs, Farzenah Ghiasvand, Daryl Parker. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 287: 502-516.
5. Daniel De Backer. Lactis acidosis. *Intensive Care Med.* 2003; 29: 699-702
6. Patricia G Rosenstein, Brett S Tennen-Brown, Dez Hughes. Clinical use of plasma lactate concentration. Prognostic and diagnostic utility and clinical management of hyperlactatemia. *Journal of veterinary emergency and clinical care.* 2018; 28: 106-121.

Validacija metode za določanje globulina GC v serumu in njegov pomen pri bolnikih s sepsa

Meta Zupančič

Splošna bolnišnica Jesenice, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Jesenice, Slovenija

UVOD

Sepsa je stanje, ki ogroža življenje, in nastane kot posledica močno izraženega sistemskega imunskega odziva na vnetje (1). Povzročitelji odziva so v 78 % primerov bakterije, od tega v 40 % Gram pozitivne (*Staphylococcus aureus*/MRSA 14 %, *Streptococcus spp.*), v 38 % pa Gram negativne (*Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiela*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Hemophilus*, *Acinetobacter*). Med okužbami z glivami prevladuje *Candida albicans* (17 %), povzročitelji pa so tudi virusi in paraziti (5 %). Okužba najpogostejše nastane v pljučih (38 %), trebušni votlini (22 %), krvi (20 %) in urinarnem traktu (14 %), redkeje pa na koži, v centralnem živčnem sistemu, mehkih tkivih ali endokardu (2). Poleg simptomov, značilnih za posameznega povzročitelja, opredelimo splošne simptome, povezane z etiopatogenezo bolezni: zvišana telesna temperatura, tahikardija, tahipneja, povišano ali znižano število levkocitov ali premik v levo v diferencialni krvni sliki, edem in zmedenost, z razvojem sepse do septičnega šoka pa tudi kot odpoved več organov (1). Incidenca sepse je težko natančno opredeliti zaradi zahtevne diagnostike, različnih kliničnih opredelitev tega patološkega stanja in pomanjkanja podatkov držav v razvoju, ocenjena je na 300 primerov na 100000 prebivalcev (3). V Sloveniji je incidenca hude sepse ocenjena na 118 primerov na 100000 prebivalcev, s stopnjo smrtnosti med 17,4 in 42,3 %, pri septičnem šoku tudi več kot 50 %, in predstavlja najpogostejši vzrok smrti bolnikov na intenzivnih oddelkih po vsem svetu (3, 4). Diagnostika sepse je zapletena in temelji predvsem na fizičnem pregledu bolnika in točkovanjih lestvicah za opredelitev bolezni. Od leta 2016 je v klinični uporabi točkovalni sistem SOFA (Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment), merilo za oceno delovanja organov (dihala, jetra, ledvice, živčni sistem, koagulacija), porast organske disfunkcije za 2 točki pa vodi v diagnozo sepse (5).

Kljub temu, da raziskave potekajo na več kot 170 različnih specifičnih laboratorijskih označevalcih za diagnostiko, spremljanje, zdravljenje in napoved izida sepse, se v današnji klinični praksi večinoma uporabljata zgolj C-reaktivni protein (CRP) in prokalcitonin (PCT), saj večina ostalih bioloških označevalcev ne dosega zadostne diagnostične specifičnosti in/ali občutljivosti za določanje. V uporabi so tudi specifični označevalci organske disfunkcije ter laktat za splošno oceno stanja bolnika (6). V naši raziskavi smo preučevali globulin GC kot morebitni označevalec za lažjo diagnostiko in spremljanje bolezni ter povezavo med koncentracijo globulina GC in smrtnostjo bolnika.

Globulin GC (Group – specific component globulin; vitamin D vezavni protein) je 51–58,000 Da velik protein iz nadružine albumina. Sestavljen je iz treh domen, na domeni 1 je vezavno mesto za D-vitamin in njegove presnovke, med domenama 2 in 3 pa se nahaja vezavno mesto za aktin (7). Sintetizira se v parenhimskih celicah jeter, delno tudi v neparenhimskih celicah, testisih in ledvicah. Fiziološko se nahaja v serumu, urinu, mleku, ascitesu, cerebrospinalni tekočini, slini, semenski tekočini in na površini imunskih celic. Izloča se prek retikuloendotelnega sistema z razpolovnim časom 48 ur (7). Serumska koncentracija pri zdravih odraslih je med 200 in 600 mg/L.

Čeprav je najbolj znana funkcija globulina GC vezava in transport vitamina D ter njegovih presnovkov, se v povezavi s sepsa bolj osredotočamo na njegovo vlogo v zunajceličnem odstranjevalnem sistemu aktina. Pri sepsi pride do obširne poškodbe celic in zato do sprostitve aktina v obtok, kjer ta spontano polimerizira (pojav diseminirane intravaskularne koagulacije). To preprečuje odstranjevalni sistem aktina, ki

ga sestavljata proteina gelsolin in globulin GC. Gelsolin razstavi in prekrije F-aktin v razmerju 1 : 2, globulin GC pa veže

prosti G-aktin in z gelsolinom prekrit aktin. Z vezavo na aktin se razpolovni čas globulina GC zmanjša na 30 minut (8).

METODE

Za merjenje koncentracije globulina GC v vzorcih bolnikovih serumov smo optimizirali in validirali imunsko turbidimetrično metodo z dvotočkovno detekcijo na avtomatskem analizatorju Cobas 8000, modul c502 (Roche, Mannheim, Germany). Validacija temelji na metodi, razviti v podjetju DAKO (DAKO A/S, Glostrup, Denmark), ki proizvaja reagente, kalibratorje in kontrolni material. Pred postopkom validacije, izvedene po standardih Eurachem guidance: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory guide to Method Validation and Related Topics, smo opravili polno šest točkovno kalibracijo z RCM matematično metodo prileganja krivulje, saj odziv (absorbanca) in koncentracija analita nista v linearni povezavi (10).

Po validaciji metode smo izvedli klinično študijo na 51 bolnikih z diagnozo sepse ali SIRS-a, nastalih zaradi različnih

vzrokov ali njihove kombinacije (diabetes melitus tipa II, hipertenzija, ishemična srčna bolezen, jetrna bolezen, COPB, kronična ledvična bolezen ali rakavo obolenje) in kontrolne skupine 29 zdravih posameznikov brez vnetij (podprto z meritvijo hs-CRP in diferencialne krvne slike) ter kroničnih ali avtoimunih obolenj. Obe skupini sta bili uravnoreženi po starosti in spolu (bolniki: 30 moških, 21 žensk v starosti 25–62 let; kontrolna skupina 13 moških, 16 žensk v starosti 29–78 let). Vzorce bolnikov smo zbrali ob postavitvi diagnoze sepsa/SIRS (dan 1), tretji (dan 3) in peti dan (dan 5) od postavitve diagnoze. Vse vzorce (razen dan 1) smo zbrali zjutraj zaradi preprečitve vpliva cirkadianega ritma globulina GC na rezultate študije. Študija je bila odobrena s strani komisije za medicinsko etiko, preiskovanci so bili seznanjeni z njenim potekom in podpisali informirani pristanek.

REZULTATI

Rezultati validacijskih parametrov so naslednji: parametri natančnosti, kot so ponovljivost (CV % med 1,38 in 1,64 %) in srednja natančnost (CV % 5,04 %), parametri omejitev metode, kot so LOB (0,426 mg/L), LOD (0,655 mg/L), LOQ (1,847 mg/L) in merilno območje (1,847–385 mg/L), linearnost metode (v območju med 8 mg/L in 332 mg/L, koeficient korelacije je 0,9953), stabilnost metode, kot sta kratkoročna temperaturna stabilnost (6 dni na 4 °C; CV % 1,08 %) in dolgoročna temperaturna stabilnost (3 mesece na 70 °C; CV % 1,34 % pri visokih koncentracijah GC globulina in 37,66 %

pri nizkih koncentracijah – stabilen je približno dva meseca).

Dokazali smo značilno razliko v koncentraciji globulina GC med bolniki s sepsa ali SIRS-om ter zdravimi posamezniki. Razlika je posledica znižanja koncentracije globulina GC zaradi njegove vloge pri odstranjevanju prostega aktina iz sistema pri bolnikih. Značilne razlike med skupino bolnikov s sepsa in skupino bolnikov s SIRS-om nismo dokazali, kar kaže na to, da po koncentraciji globulina GC ne moremo oceniti resnosti stanja bolnika.

RAZPRAVA

Najpomembnejši rezultat pri študiju spremembe koncentracije globulina GC pri napredku bolezni je značilen porast koncentracije pri bolnikih s sepsa med prvim in tretjim dnom bolezni, večinoma kot posledica zdravljenja, znižane koncentracije aktina v obtoku in pospešene sinteze proteinov. Pri SIRS-u se vrednosti globulina GC s časom ne spreminjajo značilno.

Korelacijske študije med globulinom GC in testi za označevalce odstranjevalnega sistema aktina, biokemijskimi, hematološkimi testi in testi hemostaze so pokazale pozitivno korelacijo globulina GC z gelsolinom na dan 1, ko koncentracija obeh označevalcev enakomerno pada zaradi presežka aktina, korelacija pa zaradi nesimultane sinteze v prihodnjih dneh iz-

gine. V skupini biokemijskih označevalcev smo dokazali pozitivno korelacijo s celokupnimi serumskimi proteini (pričakovano, saj sta tako globulin GC kot gelsolin del celokupnih proteinov) ter keratin kinazo in negativno korelacijo s celokupnim bilirubinom vseh 5 dni merjenja (možen porast zaradi intravaskularne hemolize pri sepsi in SIRS-u), kreatininom (povečane potrebe celic po energiji) ter prokalcitoninom. Zanimivo je, da korelacije s CRP nismo dokazali. V povezavi s hematološkimi označevalci in označevalci hemostaze smo dokazali negativno korelacijo z aktiviranim tromboplastinskim časom (APTT), vendar izključno za dan 1, medtem ko korelacije z INR nismo zaznali. Ob septični nekrozi celic se sprošča aktin, ki začne spontano koagulirati in ob tem porablja faktorje intrinzične in skupne poti koagulacije. Zanimivo je, da aktin na ekstrinzično pot koagulacije nima značilnega vpliva. Pozitivna korelacija obstaja med globulinom GC in številom trombocitov na dan 3 po postavitvi diagnoze.

Pri preučevanju povezave med koncentracijo globulina GC in smrtnostjo bolnikov smo dokazali značilno povezavo med koncentracijo ob razvoju sepse (prvi dan) s smrtnostjo po treh in sedmih dneh od razvoja bolezni. ROC krivulja tridnevne smrtnosti kaže dobro napovedno vrednost s površino pod krivuljo 0,88 in izbrano mejno vrednostjo 38,93 mg/L (diagnostična občutljivost 0,89; diagnostična specifičnost 0,5). ROC krivulja sedemdnevne smrtnosti ima slabšo napovedno vrednost

s površino pod krivuljo 0,783 in mejno vrednostjo 50,41 mg/L (diagnostična občutljivost 0,90; diagnostična specifičnost 0,5). Mejno vrednost smo izbrali na podlagi dejstva, da pri napovedovanju smrtnosti izberemo večjo občutljivost na račun specifičnosti, sploh pri sepsi, kjer bolj radikalno zdravljenje lažno pozitivnih ne povzroči večje škode za bolnika.

Značilno razliko v serumski koncentraciji globulina GC med zdravimi in bolniki s sepsa so potrdili v različnih študijah (Dahl B. et al., Gressner et al.), raziskovalna skupina L. Jeng et al. je odkrila tudi značilno razliko v koncentraciji med kritično bolnimi s sepsa ali brez nje (11, 12). V korelacijskih študijah so Gressner et al. odkrili korelacijo s komponento C5a, česar mi nismo merili, ter primerljivo z našimi rezultati niso našli korelacije s testi za oceno jetrne funkcije (AST, ALT, GGT) (11). Charalambos et al. so našli korelacijo globulina GC z označevalci hemostaze APPT, INR, številom trombocitov in koncentracijo fibrinogena, kar je podobno kot pri naših meritvah, razen INR, pri katerem nismo našli korelacije, razlika v rezultatih pa je lahko posledica razlike v uporabljenih metodah za določanje koncentracije globulina GC (13). Edina objavljena študija raziskovalne skupine Gressner et al. o umrljivosti bolnikov v korelaciji z globulinom GC ni pokazala značilne razlike v koncentraciji med umrlimi in preživelimi bolniki, vendar v nobeni izmed študij ni bilo vključeno zadostno število bolnikov, zato bi bile potrebne nadaljnje raziskave (11).

LITERATURA

1. Singer M, Deutschman S, Seymour SW, Shankar-Hari M. The Third International
2. Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock. *JAMA* 2016;315(8):801-810.
3. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):4-11.
4. Müller-Premru M, Beović B, Špik V. Mikrobiološke preiskave v diagnostiki sepse. *Zdrav Vestn*. 2013;182(7/8):445-451.
5. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR.
6. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-10.
7. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M et al. The Third
8. International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) Special Communication. *JAMA* 2016;315(8):801-810.
9. Sims CR, Nguyen TC, Mayeux PR. Could Biomarkers Direct Therapy for the Septic Patient? *J Pharmacol Exp Ther*. 2016;357(2):228-239.
10. Delanghe JR, Speckaert R, Speckaert MM. Behind the scenes of vitamin D
11. binding protein: More than vitamin D binding. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29:773-786.
12. Meier U, Gressner O, Lammert F, Gressner AM. Gc-Globulin: Roles in
13. Response to Injury. *Clin Chem*. 2006;52(7):1247-1253.
14. cobas® 8000 modular analyzer series. COBI-CD: Compendium of
15. Background Information. 2009, Roche Diagnostics GmbH
16. Magnusson B, Örnemark U. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd ed. 2014. Available from www.eurachem.org.
17. Gressner OA, Koch A, Sanson E, Trautwein C, Tacke F: High C5a levels are associated with increased mortality in sepsis patients — No enhancing effect by actin-free Gc-globulin. *Clin Biochem*. 2008;41(12):974-80.
18. Jeng L, Yamshchikov A, Judd S, Blumberg H, Martin G, Ziegler T,
19. Tangpricha V: Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J Transl Med*. 2009;23(7):28. Antoniadis CG, Berry PA, Bruce M, Cross TJS, Portal AJ, Hussain MJ, Bernal W, Wendon JA, Vergani D: Actin-Free Gc Globulin: A Rapidly Assessed Biomarker of Organ Dysfunction in Acute Liver Failure and Cirrhosis. *Liver transpl*. 2007;13:1254-61.

Vstavitev gena v plazmidni vektor in produkcija nanoteles, specifičnih za proteine glioblastoma

Staša Pečlin

Splošna bolnišnica Jesenice, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Jesenice, Slovenija

UVOD

Glioblastom multiforme (GBM), poznan tudi kot astroцитom WHO IV, je najpogostejši in najbolj agresiven primarni možganski tumor pri ljudeh. Zanj je značilna izrazita heterogenost znotraj tumorja in heterogenost med posameznimi tumorji tako na celični kot molekularni ravni. Ključni lastnosti sta tudi hitra proliferacija tumorskih celic in invazija skozi možganski parenhim. Tumorske celice so zelo gibljive in lahko migrirajo daleč stran od prvotnega tumorja v regije možganov, ključne za preživetje, kar onemogoča popoln izrez tumorja. Trenutno je GBM s konvencionalnimi načini zdravljenja še vedno neozdravljiv, preživetje bolnikov po diagnozi je 12–15 mesecev. Standardno zdravljenje bolnikov z GBM je sestavljeno iz več korakov: po maksimalnem kirurškem izrezu tumorja sledi šest tednov obsevanj in sočasne kemoterapije s temozolomidom (TMZ), po končanem kombiniranem zdravljenju pa še minimalno šest mesecev adjuvantne kemoterapije s TMZ.

Označevalci matičnih celic, povezani z GBM, so CD133, CD15, integrin-6, L1CAM, CD44, ID1 in A2B5. Daleč najbolj preučevan med njimi je CD133, ki velja kot označevalec matičnih celic v različnih normalnih in rakavih tkivih, med drugim se izraža tudi na nevralnih matičnih celicah in v GBM. V primeru GBM je izražanje CD133 povezano s krajšim preživetjem bolnika, zato lahko ta označevalec služi kot napovedni dejavnik ne glede na stopnjo tumorja, obseg kirurškega izreza in starost bolnika. CD133 je uporaben, vendar nespecifičen označevalec za identifikacijo in izolacijo glioblastomskih rakavih matičnih celic (GCSCs). Vse raziskave na tem področju zato stremijo k odkritju novih, bolj specifičnih ali bolj uporabnih označevalcev, ki bi

jih lahko uporabili za zgodnejše diagnosticiranje bolezni, klinično identifikacijo tumorja, spremljanje tumorja po kirurškem izrezu, obsevanju ali kemoterapiji, in morebiti tudi za zdravljenje GBM.

Uporaba nanoteles za iskanje novih označevalcev

Klasično IgG protitelo sestavljajo štiri polipeptidne verige, dve identični težki in dve identični lahki verigi, ki tvorijo obliko črke Y. Vsaka težka veriga ima štiri domene: variabilno (V_H) in tri konstantne (C_{H1} , C_{H2} in C_{H3}), lahka veriga pa vsebuje variabilno (V_L) in konstantno (C_L) domeno; velikost celotnega IgG protitelesa je približno 150 kDa. Najpomembnejši del protitelesa predstavlja antigen vezavni fragment oziroma regija Fab, ki prepoznavna in veže antigen (Ag).

Kamele in lame, ki spadajo v družino *Camelidae*, imajo v krvi poleg konvencionalnih protiteles še poseben podtip IgG protitelesa, ki ne vsebujejo lahkih verig, zato jih imenujemo protitelesa s težko verigo (HcAbs). Poleg lahkih verig jim manjkajo tudi konstantne domene C_{H1} na težkih verigah, ki so ključne za povezavo z lahko verigo. Antigen vezavni fragment Fab v tem primeru predstavlja ena sama variabilna domena HcAbs (VHH), najmanjši naravno pridobljeni fragment protitelesa, sposoben prepoznavne in vezave Ag, ki so ga kasneje poimenovali nanotelo (Nb).

S pomočjo rekombinantne tehnologije lahko nanoteles (Nbs) dokaj enostavno pridobivamo v različnih organizmih, kot so *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus*,

Aspergillus awamori, *Pichia pastoris* in *Nicotiana tabacum*, ter dosežemo dobre donose. Nbs so dobro topna in zelo stabilna; tudi po izpostavitvi visokim temperaturam (do 90 °C) in nefiziološkim vrednostim pH lahko specifično prepoznajo in vežejo Ag. Zaradi majhne velikosti (14 kDa) lahko prehajajo krvno-možgansko pregrado in prebavni trakt, zato bodo v prihodnosti morda primerna za oralno imunoterapijo.

Projekt Glioma

Z namenom iskanja novih označevalcev GBM so iz tumorskega tkiva enega bolnika z GBM izolirali tumorske celice in pripravili človeško GBM celično linijo. Odraslo alpako (*Vicugna pacos*) so večkrat imunizirali s celimi celicami GBM in iz krvi pridobili limfocite. Iz limfocitov so izolirali informacijsko RNA (mRNA) in jo uporabili za sintezo kompleksne DNA (cDNA). Na podlagi cDNA so naredili dve verižni reakciji s polimerazo (PCR); s prvim PCR so pom-

nožili zapise za konvencionalna IgG protitelesa in HcAbs, z drugim pa zapise za variabilno domeno HcAbs (VHH ali Nb). Pomnožene gene za Nbs so vstavili v fagmidni vektor pHEN4 in transformirali elektrokompetentne bakterije *E. coli* TG1. Transformirane celice *E. coli* TG1 so okužili s pomožnimi fagi M13K07 in povzročili sestavljanje fagnih delcev, ki na svoji površini izražajo Nbs. S pomočjo predstavitev na fagih in imunoafinitetne selekcije so pridobili fagne delce z bolj specifičnimi Nbs za proteine GBM. Z njimi so okužili *E. coli* TG1 v eksponentni fazi rasti in jih gojili na trdnem gojišču za kasnejše pregledovanje knjižnice Nbs z encimskoimunskim testom (ELISA). Bakterijske kolonije *E. coli* TG1, ki so imele vsaj dvakrat višji signal ELISA v primerjavi z negativno kontrolo, so uporabili za PCR na osnovi bakterijske kolonije, pomnožene gene za Nbs poslali na določanje nukleotidnega zaporedja, bakterijske kolonije pa uporabili za prenos nanotelesnih genov v drug vektor in produkcijo Nbs v večjem obsegu.

NAMEN RAZISKAVE

Namen te raziskave je bila produkcija dveh nanoteles, specifičnih za proteine, ki se v GBM izražajo drugače kot v normalnem možganskem tkivu, identifikacija pripadajo-

čih antigenov in njuna povezava z rakom na splošno oziroma z GBM.

METODE

1. Prenos nanotelesnih genov iz vektorja pHEN4 v vektor pHEN6c

Ob vključitvi v raziskovalno skupino smo z imunoafinitetno selekcijo dobili dva Nb-gena, vstavljena v fagmidni vektor pHEN4, ki vsebuje hemaglutininski označevalec (HA-tag). S postopkom prenosa nanotelesnih genov v drug vektor smo Nb-gena predstavili v ekspresijski vektor pHEN6c, ki vsebuje heksahistidinski označevalec (His₆-tag) in omogoča bolj učinkovito čiščenje rekombinantnih proteinov po produkciji, nato pa transformirali kompetentne bakterije *E. coli* WK6. Fagmidni vektor pHEN4 in ekspresijski vektor pHEN6c vsebujeta pred zapisom za Nb signalno zaporedje PelB, ki usmerja rekombinantni protein v periplazemski prostor *E. coli*.

2. Določanje nukleotidnega zaporedja

Iz nukleotidnega zaporedja Nb-genov smo določili proteinska zaporedja Nbs in pridobili informacijo o njihovi molekularni masi.

3. Produkcija nanoteles, specifičnih za proteine glioblastoma

Za produkcijo Nbs smo izbrali ustrezen ekspresijski sistem *E. coli* WK6. Z dodatkom IPTG (izopropil-D-1-tiogalaktopiranozid) smo sprožili izražanje Nbs, ki so se zaradi signalnega zaporedja PelB prenesla v periplazemski prostor *E. coli*. S pomočjo osmotskega šoka smo pridobili

periplazemski ekstrakt, v katerem so se nahajala Nbs, po produkciji Nbs očistili z imobilizirano kovinsko afinitetno kromatografijo (IMAC) in preverili njihovo velikost s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE). Nbs smo nato še dodatno očistili s kromatografijo z ločevanjem po velikosti (SEC).

REZULTATI

Z masno spektrometrijo smo uspeli določiti antigena za obe nanotelesi:

- mitohondrijski elongacijski faktor Tu (angl. elongation factor Tu, mitochondrial; TUFM)
- proteinu za sestavljanje nukleosoma 1-podoben protein 1 (angl. nucleosome assembly protein 1-like 1; NAP1L1)

RAZPRAVA

Mitohondrijski elongacijski faktor Tu (TUFM) je 49,5 kDa velik protein, ki sodeluje pri translaciji proteinov v mitohondrijih. Kodiran je iz jedrne DNA, sintetizira se v citoplazmi in potuje v mitohondrij, kjer opravlja svojo funkcijo. Njegova glavna funkcija je omogočanje od GTP-odvisne vezave aminoacilne-tRNA na A-mesto ribosoma, s tem pa podaljševanje sinteze proteinov v mitohondrijih. TUFM skupaj s številnimi drugimi proteini, kodiranimi iz jedrne DNA, sestavlja mitohondrijski translacijski aparat za sintezo proteinov iz mtDNA. TUFM se izraža v vseh človeških tkivih, raven izražanja pa sovпада s stopnjo oksidativne presnove v celicah posameznih tkiv. Močno izražanje TUFM je značilno za jetra, ledvice, srce in možgansko tkivo (visoka stopnja oksidativne presnove), medtem ko je bistveno nižje v vrani, skeletnih mišicah, trebušni slinavki in pljuči. TUFM se prekomerno izraža v številnih tumorjih človeškega in živalskega izvora; povečano izražanje so zaznali pri kolorektalnem raku, pljučnem raku, raku požiralnika in želodca. V eni izmed študij so preučevali prognostični vpliv TUFM pri kolorektalnem raku. Ugotovili so, da je povečano izražanje TUFM povezano z znatno krajšim preživetjem bolnika. Ker je bila raven izražanja TUFM neodvisna od stadija bolnika, bi močno izražanje proteina TUFM lahko služilo kot neugoden napovedni označevalec pri kolorektalnem raku.

4. Priprava parov nanotelo-antigen za masno spektrometrijo

Za pripravo parov nanotelo-antigen (Nb-Ag) smo uporabili vzorec Nbs po SEC-u in celični lizat glioblastomskih celic NCH mix (NCH644 in NCH421K).

Glede na način selekcije s testom ELISA, ki je bila narejena pred postopkom prenosa Nb-genov v drug vektor, lahko sklepamo, da je izražanje obeh proteinov v GBM povečano v primerjavi z normalnim možganskim tkivom.

Proteinu za sestavljanje nukleosoma 1-podoben protein 1 kot potencialni označevalec za GBM

Proteinu za sestavljanje nukleosoma 1-podoben protein 1 (NAP1L1) je 45,4 kDa velik protein, ki ima v celici različne funkcije. Pomembno vlogo igra pri sestavljanju in razstavljanju nukleosomov, remodeliranju kromatina in pri transportu histonov iz citoplazme v jedro; poleg tega lahko vpliva na izražanje genov, napredovanje celic skozi celični ciklus in apoptozo. Povečano izražanje NAP1L1 so zaznali v jetrih ploda, pri hepatoblastomu, raku črevesja in manjših nevroendokrinih tumorjih abdomna. V eni izmed študij so preučevali vlogo NAP1L1 pri proliferaciji nevroendokrinih tumorjev pankreasa. V primarnih tumorjih in metastazah so zaznali povečano izražanje NAP1L1 in zmanjšano izražanje zaviralca od ciklina odvisne kinaze p57 (na ravni mRNA in proteinov) v primerjavi z normalnim tkivom. Izražanje NAP1L1 pozitivno korelira z velikostjo tumorja; večje kot je izražanje NAP1L1, večji in težji bo tumor.

ZAKLJUČEK

Proteina TUFM in NAP1L1 sta citoplazemska in ne membranska proteina, kot bi lahko predvidevali glede na imunizacijo alpake. Sklepamo lahko, da je v organizmu alpake prišlo do lize GBM celic, njen imunski sistem pa se je odzval na vse proteine (membranske in citoplazemske) s tvorbo HcAbs. Da bi proteina TUFM in NAP1L1 lahko natančno ovrednotili kot potencialna označevalca za GBM, bi bilo treba validirati rezultate, dobljene z masno spektrometrijo. Smiselno bi bilo kvantitativno določiti izražanje obeh mar-

kerjev v tumorskem tkivu večjega števila bolnikov z GBM, v komercialno dostopnih GBM celičnih linijah in normalnem možganskem tkivu. Nivo izražanja bi lahko določali na ravni mRNA s tehniko kvantitativnega PCR (qPCR) in na ravni proteinov s tehniko prenosa po Western. Pričakovali bi, da bo izražanje teh dveh označevalcev na ravni mRNA in proteinov v tumorskem tkivu in v GBM celičnih linijah večje v primerjavi z normalnim možganskim tkivom.

LITERATURA

1. Inda MDM, Bonavia R, Seoane J. Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature. *Cancers*. 2014; 6(1): 226-239.
2. Jhanwar-Uniyal M, Labagnara M, Friedman M, Kwasnicki A, Murali R. Glioblastoma: Molecular pathways, stem cells and therapeutic targets. *Cancers*. 2015; 7(2): 538-555.
3. Kijanka M, Dorresteijn B, Oliveira S, van Bergen en Henegouwen PMP. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomedicine*. 2015; 10(1): 161-174.
4. Hassanzadeh-Ghassabeh G, Devoogdt N, De Pauw P, Vincke C, Muyldermans S. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine*. 2013; 8(6): 1013-1026.
5. Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009; 128(1-3): 178-183.

Znotrajcelični renin angiotenzinski sistem

Meta Zupančič, Darko Černe

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija

UVOD

Sistem renin-angiotenzin-aldosteron (RAS) je eden najbolj zgodaj odkritih in najbolj preučevanih proteinskih kaskadnih sistemov v človeškem telesu. Renin je bil odkrit že leta 1898, celotna osnovna kaskada sistema pa 40 let kasneje, vendar vse do sedemdesetih let prejšnjega stoletja vloga posameznih komponent ni bila podrobno opredeljena. Na podlagi novih odkritij na področju RAS in njegove vloge pri uravnavanju hemostaze vode in elektrolitov so šele leta 1971 v klinično uporabo prišla prva zdravila za zdravljenje diastolične hipertenzije – tiazni diuretiki (npr. Captopril®) (1). V nadaljevanju so odkrili številne nove peptide, encime in receptorje RAS, kar je vodilo v delitev osnovnega sistemskega mehanizma na več med seboj povezanih biokemijskih poti, v zadnjem desetletju pa izreden pomen dobiva tudi odkritje parakrine, avtokrine in intrakrine vloge RAS (1).

Začetek klasične kaskade RAS je sinteza encima renin-aspartil proteaze, ki se sintetizira v jugstaglomerularnem aparatu ledvic kot prekursor prorenin zaradi padca arterijskega tlaka, znižane koncentracije natrija ali zvečane vzdražnosti simpatika. V aktivno obliko se renin pretvori pod vplivom katepsinov B ali prokonvertaze in se izloča v sistemsko cirkulacijo, kjer cepi peptidno vez med Leu10 in Val11 na N-terminalnem delu proteina angiotenzinogena. Angiotenzinogen (AGT) je prekursorski protein, ki ga v največji meri sintetizirajo hepatociti, v manjšem obsegu pa tudi kardiomiociti ter adpociti in se izloča v cirkulacijo. Po cepitvi ANG nastane angiotenzin I (ANGI), ki se pretvori v najbolj aktivno obliko hormona angiotenzin II (ANGII) z encimom angiotenzin konvertaza I (ACEI). ANGII prek reakcij s specifičnimi receptorji, najpogostejši je transmembranski receptor angiotenzina ena (ATRI), stimulira številne signalne poti v najrazličnejših organih, kot so srce, obtočila, ledvice, adipozno tkivo, trebušna slinavka, možgani in sproža tako sistemske kot lokalne učinke (2). Sistemski učinki vezave ANGII na ATRI so: 1) sistem-

ska vazokonstrikcija arteriol in s tem zvišanje krvnega tlaka, povečana reabsorpcija v tubulih ledvic; 2) zvečana reabsorpcija natrija v Henleyevi zanki; 3) sproščanje hormona aldosterona iz skorje nadledvične žleze in 4) sproščanje antidiuretskega hormona (vazopresin) in s tem reabsorpcija vode. Lokalno spodbuja tudi celično proliferacijo in fibrozo tkiva (3). Zadnji hormon kaskade RAS je mineralokortikoidni hormon aldosteron, ki je glavni regulator volumna zunajcelične tekočine in elektrolitskega ravnovesja v organizmu (3).

TKIVNI RAS

Poleg sistemskega delovanja RAS učinkuje tudi na lokalni ravni. Izraz se nanaša na tkivne mehanizme tvorbe angiotenzinskih peptidov, ki so neodvisni od sistemskega delovanja, značilna je prisotnost komponent RAS na lokalni ravni, lokalna sinteza renina in angiotenzinogena ter vezava angiotenzinskih peptidov na specifične receptorje v okolnem tkivu (4). Molekularni mehanizmi sinteze komponent RAS so v osnovi podobni delovanju sistemskega RAS, vendar se izražajo tkivno specifično (npr. sinteza ANGII v kardiomiocitih v hiperglikemičnih pogojih poteka skoraj izključno z encimom kimaza in ne klasično z ACEI). Odkrili so tudi molekulske mehanizme, ki so izključno tkivne narave. Primer je vezava in privzem prorenina in renina prek manosa-6-fosfat receptorja v humane endotelijske celice, s čimer okolno tkivo odstranjuje presežek hormonov (5).

Tkivni RAS glede na mesto sinteze komponent delimo na zunajcelični in znotrajcelični sistem. Zunajcelična sinteza poteka v tkivnem intersticiju iz lokalno ali sistemsko sintetiziranih komponent, iz česar je jasno razvidno, da sta lahko tkivni in sistemski RAS med seboj povezana. Primer take povezave je debelost, kjer adipociti prispevajo do 30 % sinteze ANGII v sistemski cirkulaciji (4).

ZNOTRAJCELIČNI RAS

Iz raziskav v zadnjih tridesetih letih je jasno razvidno, da poteka tudi znotrajcelična sinteza proteinov RAS. V celicah srčnega, ledvičnega, žilnega, možganskega in maščobnega tkiva so dokazali obstoj molekul: AGT, ANGII, heptapeptid angiotenzin 1-7 (ANG(1-7)), prorenin, nekaj izoform renina, ATRI, ATRII, receptor Mas, angiotenzinski konvertazi ena in dve (ACEI, ACEII), kimaze (6). Znotrajcelična sinteza proteinov RAS (iRAS) poteka po podobnem osnovnem mehanizmu kot pri sistemske RAS, zaradi značilno različne posttranslacijske glikozilacije pa se iz celice ne izločajo. V celici se komponente nahajajo vezane v membrane (različni receptorji ter iRenin) kot prosti proteini v citoplazmi ali jedru ali na endoplazmatskem retikulumu (6).

Do sedaj raziskani aktivatorji iRAS so zunajceličnega izvora. Najbolje proučena je vezava zunajceličnega ANGII na receptor ATRI na celični membrani, ki preko signalnih poti p38MAPK/ERK1/2 in NF- κ B regulira celično transkripcijo, znotrajcelično sintezo pa lahko sproži tudi hiperglikemija ali vnetje v okolnem tkivu. Predpostavljajo, da imajo proteini znotrajcelične sinteze sposobnost tvorje-

nja pozitivnih povratnih zvez, kar vodi v spremembo fenotipa celice in s tem v modulacijo številnih fizioloških in patofizioloških procesov (7).

Pomembne so alternativne biokemijske poti, ki se izražajo izključno znotrajcelično, med katerimi je najbolj proučevana biokemijska os ACEII-Ang(1-7)-MasR. ANG(1-7) se povezuje z receptorjem Mas in sproži sistemske učinke, ki delujejo antagonistično učinkom ANGII, to je antiaritmčno in antitrombotično ter zavirajo vazokonstrikcijo in celično proliferacijo (8).

Poleg poznanih sistemskih učinkov ima lokalna sinteza ANGII v celicah druge funkcije, kot so stimulacija sinteze NO in ROS, sprememba koncentracije kalcija v celici in celičnega dihanja ter stimulacija transkripcije posameznih genov (7).

Dejstvo je, da za različne tipe celic biokemijske poti iRAS sistema in njegova vloga pri patofizioloških procesih še niso podrobno raziskane, vendar se nam odpira novo široko področje raziskovanja RAS, njegove regulacije, tkivnih učinkov in možnih farmacevtskih tarč.

NAMEN RAZISKAVE

Namen naše raziskave je preučiti pomen, vlogo in molekularne mehanizme iRAS v endotelijskih celicah žilne stene. S preliminarnimi »proof of concept« študijami so Janić in sod. ugotovili pozitivne učinke subterapevtskih koncentracij fluvastatina in valsartana na endotelijske celice žilne stene velikih žil v povezavi z zdravljenjem ateroskleroze in njenih zapletov. Molekulski mehanizmi, odgovorni za pojav njihovih pozitivnih učinkov na žilno steno še niso pojasnje-

ni, zato si v naši študiji želimo razložiti molekulske mehanizme iRAS, tretirati endotelijske celice s subterapevtskimi koncentracijami fluvastatina, valsartana in kombinacije obeh učinkovin (1/4 terapevtske koncentracije) ter na podlagi ugotovitev natančneje pojasniti učinke fluvastatina in valsartana na ohranitev funkcije žilne stene prek izražanja komponent iRAS. V nadaljevanju predstavlja dve od dosedanjih raziskav.

METODE

Prva raziskava je bila narejena na miškah Wistar. Miši enake teže, spola in starosti smo naključno razdelili v 7 skupin: kontrolno skupino, prejemnike terapevtskih odmerkov fluvastatina (20 mg/kg/dan), valsartana (30 mg/kg/dan) ali kombinacije učinkovin (fluvastatin 20 mg/kg/dan, valsartan 30 mg/kg/dan) ter prejemnike subterapevtskih odmerkov fluvastatina (4 mg/kg/dan), valsartana (6 mg/kg/dan) ali

kombinacije učinkovin (fluvastatin 4 mg/kg/dan, valsartan 6 mg/kg/dan). Miškam smo šest tednov merili sistolični krvni pritisk, nato pa po evtanaziji izolirali kri, srce in rezine torakalne aorte za meritve holesterolov, LDH, mRNA izbranih vazoaktivnih genov (izražanje AGRI, NOS3, IL-1 β , endotelinski receptor 1a), od endotelija odvisno relaksacijo aorte in za merjenje pretoka skozi koronarne arterije (9).

V drugi raziskavi smo uporabili primarne humane endotelijske celice koronark, izolirane iz umrlega dajalca, saj predstavljajo najboljši model raziskovanja dogajanja v organizmu. Po tretiranju s stresorjem serumskim amiloidom A (SAA) in s terapevtskimi odmerki fluvastatina, valsartana in kombinacije učinkovin smo lizirali celice ter zbrali supernatante za izolacijo mRNA ter detekcijo izražanja

genov za proteine/encime/receptorje/signalne molekule sistema iRAS ter za imunoblotting proteinov, vključenih v signalne/regulacijske poti sistema iRAS. V nadaljnjih eksperimentih planiramo uporabo še drugih stresorjev, kot je ANGII, uporabo subterapevtskih odmerkov obeh zdravil, merjenje sintetiziranega NO in stopnje celičnega oksidacijskega stresa.

REZULTATI

Rezultati študije (9, 10): Meritve sistoličnega pritiska po šestih tednih kažejo učinkovito znižanje pri terapevtskih koncentracijah valsartana in kombinacije obeh učinkovin. Ugodno, zaželeno relaksacijo aortne stene po tretiranju z acetilholinom povzročajo predvsem subterapevtske koncentracije učinkovin, razlika od kontrolne skupine pa je očitna tudi pri ostalih skupinah. Pri merjenju pretoka skozi koronarne arterije po izpostavitvi srca ishemiji je bil ta najbolj povečan pri skupini s subterapevtskim odmerkom fluvastatina in valsartana ter nekoliko manj pri ostalih skupinah, če jih primerjamo s kontrolno. Tudi koncentracije laktatne dehidrogenaze (LDH) kot označevalca poškodbe kardiomiocitov so bile najnižje pri skupini s subterapevtskimi koncentracijama učinkovin, nekoliko višje pa pri ostalih skupinah. Pri meritvah biokemijskih označevalcev so bili znižani LDL holesterol in trigliceridi zgolj v skupinah, tretiranih

s terapevtskimi odmerki fluvastatina in kombinacijo obeh učinkovin. Pri merjenju ekspresije genov povečata izražanje *NOS3* in s tem sintezo NO zgolj subterapevtska in terapevtska koncentracija obeh učinkovin. Z izjemo pri subterapevtski koncentraciji valsartana se je pri vseh skupinah znižala transkripcija gena za intreleukin 1.

V primarnih humanih endotelijskih celicah koronark smo z analizo mRNA opazili, da se mediatorji iRAS in encimi njihove sinteze ne izražajo (AGT, renin, kimaza, ACE-II). Tudi po stimulaciji celic z SAA do njihovega izražanja ne pride. V celicah se izraža samo ACEI. Med receptorji iRAS smo opazili šibko izražanje ATRI, ki ga je SAA zvečal. Zanimivo, zdravili v terapevtskem območju sta zvečali izražanje ATRI še bolj kot sam SAA. Izražanje ATRII je bilo še manj pomembno.

RAZPRAVA

V preliminarni študiji smo prikazali, da subterapevtske koncentracije fluvastatina in valsartana na mišjih modelih najboljše učinkujejo na žilno steno in srce, saj prek učinkov na žilne endotelijske celice povzročajo relaksacijo žilne stene velikih žil in povečujejo pretok krvi skozi koronarne arterije, zmanjšujejo pa tudi poškodbo srčne mišice po izpostavitvi tkivni ishemiji, podprti z meritvijo LDH. Pomembna ugotovitev je, da so zaščitni učinki najmočnejši pri tretiranju s kombinacijo zdravilnih učinkovin, in da so rezultati najboljši pri subterapevtskih odmerkih, ki imajo tudi za bolnika manj stranskih učinkov. Z dosedanjim znanjem pa biokemijskih procesov, ki potekajo v ozadju, ne znamo zadovoljivo razložiti. Ker so rezultati zelo obetavni, so nujne nadaljnje raziskave. V začetnih raziskavah na primarnih humanih celicah smo ugotovili, da se mediatorji iRAS in

encimi njihove presnove v endotelijskih celicah koronark ne izražajo, tudi po stimulaciji s stresorjem SAA. Izraža se samo ACEI, ki pa nima substrata encimske reakcije (ANGI), zato pomena ne razumemo. Opazili pa smo šibko izražanje AGTRI, ki ga stresor SAA poveča, še bolj pa kombinacija obeh zdravil v terapevtskem območju. To bi lahko imelo pomembne posledice. Po podatkih iz literature del ANGII (po vezavi na membranski ATRI in receptorski endocitozi) uide lizosomalni razgradnji in se sprosti v citoplazmo. Takšen nerazgrajen ANGII se lahko veže na celične ATRI in povzroča učinke iRAS (11).

LITERATURA

1. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res*. 2016;118:535–546.
2. Guang C, Phillips RD, Jiang B, Milanic F. Three key proteases – angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin – within and beyond the renin-angiotensin system. *Arch Cardiovasc Dis*. 2012;05:373-385.
3. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Spec Pharm*. 2007;13(8):9-20.
4. Černe D. Molekularni mehanizmi nastanka debelosti s poudarkom na vlogi sistema renin-angiotenzin-aldosteron. *Farmacevtski vestnik*. 2016;67.
5. Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol Rev*. 2006;86:747–803.
6. Re RN. The role of intracellular angiotensin II. *Am J Physiol Heart Circ*. 2018;314(4):H766-H771.
7. Re RN, Cook JL. Potential therapeutic implications of intracrine angiotensinogenesis. *Med Hypotheses*. 2007;69(2):414–421.
8. Varagic J, Trask AJ, Jessup JA, Chappell MC, Ferrario CM. New angiotensins. *J Mol Med (Berl)*. 2008;86(6):663–671.
9. Janić M, Lunder M, Štiglic AF, et al. Sub-therapeutic doses of fluvastatin and valsartan are more effective than therapeutic doses in providing beneficial cardiovascular pleiotropic effects in rats: A proof of concept study. *Vascul Pharmacol*. 2017;99:45-52.
10. Janić M, Lunder M, Šabovič M. A Low-Dose Combination of Fluvastatin and Valsartan: A New “Drug” and a New Approach for Decreasing the Arterial Age. *Biomed Res Int*. 2015;2015:235709.
11. Kumar R, Yong QC, Thomas CM, Baker KM. Intracardiac intracellular angiotensin system in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012;1;302(5):R510-7.

Uporabnost laboratorijske diagnostike pri napovedovanju glikemičnega indeksa po zaužitju s prehransko vlaknino obogatenega zajtrka

Tomaž Polak¹, Mateja Lušnic Polak¹, Lea Demšar¹, Lenka Gašperlin², Ivica Avberšek-Lužnik²

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija

² Splošna bolnica Jesenice, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Jesenice, Slovenija

Trenutno je zanimanje raziskovalcev usmerjeno v uporabo s prehransko vlaknino bogatih živil kot potencialnih sestavin za zmanjšanje glikemičnega indeksa jedi, ki temeljijo na ogljikovih hidratih. Cilj naše študije je bil preučiti glikemični odziv na referenčni zajtrk, oblikovan za učence osnovnih šol v Sloveniji, in zajtrk, obogaten s prehransko vlaknino (testni). Referenčni in testni zajtrk sta se razlikovala le po vrsti kruha (bel vs. polnozrnat) in sta bila prostovoljcem (2 moška, 8 žensk) na tešče ponujena trikrat. Koncentracijo glukoze v njihovi kapilarni krvi smo določili 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 in 120 minut po zajtrku. Za obe vrsti zajtrkov smo iz inkrementalnih površin pod krivuljami izračunali glukozne odzive in jih za izračun glikemičnih indeksov primerjali z vrednostmi za glukozo (Wolever in sod., 1991). Sočasno smo na podlagi kemijske sestave obrokov glikemični indeks tudi izračunali (Anonimus, 1998); izračunani glikemični indeks referenčnega zajtrka je bil 41, pri testnem zajtrku pa 39. Izračunani in izmerjeni glikemični indeksi mešanih obrokov se močno razlikujejo, predvsem zaradi medsebojne interakcije živil v človeškem prebavnem trak-

tu, ki upočasni hitrost absorpcije glukoze. Torej, izmerjena povprečna glikemična indeksa sta bila po zaužitju referenčnega zajtrka $26,6 (\pm 6,2)$, testnega zajtrka pa $18,1 (\pm 6,0)$. Glikemična obremenitev testnega zajtrka z mešanimi živil in polnozrnatim kruhom, obogatenim s topno vlaknino (β -glukani), je bila manjša kot pri belem kruhu, polnozrnat kruh je pri prostovoljcih povzročil počasnejši in manjši glikemični odziv. Razlike glikemičnega indeksa so bile sicer med prostovoljci velike, nekateri so pokazali manjše (glikemični indeks, 12,4–21,1), nekateri pa velike odzive na testni zajtrk (glikemični indeks, 25,9–27,4). Kljub velikim razlikam pa smo potrdili, da je glikemični indeks mešanih obrokov primerno orodje za oceno učinkov na glukoregulacijo. Eden od ciljev bil tudi ozaveščanje javnosti o pomenu kombinacije živil v obroku, predvsem z vidika obvladovanja povečanja glikemičnega indeksa. S to študijo dokazujemo, da lahko z zajtrkom, ki ga določi neka avtoriteta in se v praksi tudi aplicira, pomembno vplivamo na prehransko vedenje šolarjev.

LITERATURA

1. Wolever T. M. S., Jenkins D. J. A., Jenkins A. L., Josse R.: The glycemic index: methodology and clinical implications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54, 1991, pp. 846–854. DOI: 10.1093/ajcn/54.5.846.
2. Carbohydrates in Human Nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. FAO Food and Nutrition Paper, 66. Rome: FAO, 1998. ISBN 92-5-104114-8.
3. Glade M. J., Smith K. D. C.: A glance at ... glycemic index. *Nutrition*, 31, 2015, pp. 539–541. DOI: 10.1016/j.nut.2014.10.013.
4. Scazzina F., Dall'Asta M., Casiraghi M. C., Sieri S., Del Rio D., Pellegrini N., Brighenti F.: Glycemic index and glycemic load of commercial Italian foods. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 26, 2016, pp. 419–429. DOI: 10.1016/j.numecd.2016.02.013.

02

Biološka
variabilnost in
nekateri druge
aktualne teme
s področja
laboratorijske
medicine

EUBIVAS: spremembe, ki jih lahko pričakujemo v medicinskih laboratorijih

Eva Fliser

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

UVOD

Biološka variabilnost ima v laboratorijski medicini izjemen pomen, saj se pojavlja na mnogih pomembnih področjih našega dela – od referenčnih intervalov, validacij novih postopkov, oblikovanja specifikacij kakovosti, vključno z ocenjevanjem ustreznosti naših analiznih metod in njihovim izboljševanjem, do vrednotenja zunanje in notranje kontrole ter postavljanja meril avtovalidacije. Njena uporabnost je izjemno široka.

V preteklih desetletjih so bile objavljene številne študije o biološki variabilnosti posameznih analitov. Njihova pomanjkljivost so premalo natančni podatki o predanaliznih dejavnikih in/ali metodah določevanja, prav tako so bile številne metode določevanja spremenjene oz. standardizirane. S projektom EUBIVAS dobivamo bolj natančne in zanesljive podatke o biološki variabilnosti v evropski populaciji. Objavljene so informacije za prvih 45 analitov – 21 hematoloških, 23 biokemijskih ter PSA. Informacije o tem lahko

najdemo tudi v novi bazi podatkov o biološki variabilnosti, ki jo vodi Evropsko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (EFLM) in je aktivna od maja 2019.

Študije EUBIVAS so prve, ki so izvedene po novem standardu za izvajanje študij o biološki variabilnosti (BIVAC – The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist: A Standard for Evaluating Studies on Biological Variation). Zanje torej velja, da so izvedene pod strogimi merili glede izbora referenčnih posameznikov, odvzema biološkega materiala, priprave, shranjevanja in transporta vzorcev, analize ter statistične obdelave vzorcev. Pridobljene vrednosti biološke variabilnosti so zato za večino analitov nižje v primerjavi z drugimi podatki. Zato lahko v medicinskih laboratorijih pričakujemo spremembe pri delu, predvsem pri specifikacijah analiznih metod, vrednotenju notranje in zunanje kontrole, vrednotenju izmerjenih rezultatov ter vrednotenju vpliva interferenc na meritve.

PRIMERI SPREMEMB, KI JIH LAHKO PRIČAKUJEMO V MEDICINSKIH LABORATORIJIH ZARADI ŠTUDIJ EUBIVAS

Specifikacije (specifikacije kakovosti ali aps – analytical performance specifications)

Specifikacije določajo, kakšne naj bodo lastnosti analiznih metod, ki jih uporabljamo za meritve v medicinskih laboratorijih. Določajo priporočljivo največjo nenatančnost (koeficient variacije) in nepravilnost metode določevanja (bias). Specifikacije so namenjene proizvajalcem merilne opreme/reagentov ter tudi uporabnikom, laboratorijem kot informacija, kakšne naj bodo metode določevanja, ki jih uporab-

ljamo za opravljanje rutinskih meritev. Zaželeni cilji specifikacij kakovosti so povezani z biološko variabilnostjo:

- nepreciznost metode določevanja: $CV_a < \frac{1}{2} CV_i$
- bias metode določevanja: $B_A < 0,25 \times (CV_i^2 + CV_G^2)^{0,5}$

CV_a – nepreciznost metode določevanja

CV_i – intraindividualna biološka variabilnost

CV_G – interindividualna biološka variabilnost

B_A – bias metode določevanja

Specifikacije so običajno podane poleg podatkov o biološki variabilnosti. Ker obstajajo različne študije o biološki variabilnosti, obstajajo tudi različne specifikacije. Pomembno je, da uporabljamo zanesljive vire specifikacij oz. da so študije, po katerih povzemamo podatke, zanesljivo izvedene.

Ker dobivamo s študijami EUBIVAS za večino analitov nižje biološke vrednosti v primerjavi z drugimi podatki, velja, da so tudi specifikacije za večino analitov nižje. S temi študijami dobivamo torej za večino analitov strožja merila, kakšne naj bodo analizne metode.

PRISOTNOST INTERFERENC, KI VPLIVAJO NA MERITVE ANALITOV

Prisotnost interferenc in njihov vpliv na meritve analitov ugotavljamo s pomočjo CLSI standarda EP7-A2 (Interference testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline – Second Edition). Standard pri tem ne navaja merila, kdaj je interferenca v resnici prisotna; izbor prepušča izvajalcu. Najpogosteje se v ta namen uporablja celokupna analitična napaka TEa. Izračuna se s pomočjo koeficienta variacije in biasa, pri čemer lahko uporabljamo specifikacije biološke variabilnosti ali značilnosti naših lastnih metod.

$$TE_a = 1,65 \times CV_a + B_a$$

Zaradi nižjih vrednosti biološke variabilnosti, priporočljive največje nenatančnosti (koeficienta variacije) in nepravilnosti metod določevanja (biasa) študije EUBIVAS podajajo tudi nižje TEa vrednosti. Zato lahko po študijah EUBIVAS pričakujemo strožja merila za oceno prisotnosti interferenc in pogostejše zavračanje rezultatov meritev za večino analiznih metod.

PREPOZNAVANJE PATOLOŠKEGA PROCESA PRI PACIENTU

Patološki proces pri pacientu ugotavljamo s primerjavo laboratorijskega rezultata s pričakovano vrednostjo – referenčnim intervalom. Vendar slednji ne zadošča vedno za oceno odstopanja rezultata. Najpogosteje se s tem soočamo:

- pri tistih analitih, ki imajo majhno intraindividualno variabilnost v primerjavi s široko interindividualno variabilnostjo, zaradi katere je referenčni interval (pre)širok; pri pacientu lahko nastopi bistvena sprememba stanja, tudi če sta dva zaporedna rezultata analita znotraj referenčnega intervala (npr. pri kreatininu, ALP, GGT, CHE);
- pri tistih analitih, pri katerih je bolj kot referenčni interval pomembna mejna vrednost, ki potrjuje ali izključuje domnevno patološki proces, a ta ni zanesljivo podana in raje opravimo več zaporednih meritev (npr. visoko senzitivni troponin).

Pomoč pri prepoznavanju patološkega stanja pri pacientu lahko predstavlja RCV ali Reference change value. Izračunava se s pomočjo nepreciznosti analizne metode in intraindividualne biološke variabilnosti (upoštevamo variabilnost pri posamezniku in analizo variabilnost analita). RCV je tista najmanjša sprememba, ki predstavlja statistično značilno razliko med dvema zaporednima meritvama pri istem pacientu:

$$RCV = 2^{1/2} \times Z \times [CV_a^2 + CV_i^2]^{1/2}$$

$$Z (95 \%) = 1,65$$

$$Z (99 \%) = 2,33$$

Kadar želimo ugotoviti, ali se drugi rezultat razlikuje od prvega (t. i. unidirektni odnos dveh meritev), se kot faktor Z uporabljata vrednosti $Z=1,65$ za 95-odstotno oz. $Z=2,33$ za 99-odstotno verjetnost.

Z nižjimi vrednostmi biološke variabilnosti in specifikacij analiznih metod po študijah EUBIVAS se zmanjšuje tudi RCV. To pomeni, da bomo že pri manjših povišanjih ali zni-

žanjih vrednosti analita glede na predhodni laboratorijski rezultat pomislili na spremenjeno klinično stanje pacienta.

Primer vrednotenja kreatinina pri pacientu s pomočjo RCV (podano za 99-odstotni interval zaupanja):

RCV (kreatinin, Ricosova baza podatkov, 2014; podano le za Jaffejevo metodo določevanja) = 21,8 %

RCV (kreatinin, EUBIVAS, 2017, Jaffejeva metoda določevanja) = 21,2 %

RCV (kreatinin, EUBIVAS, 2017, encimska metoda določevanja) = 14,9 %

Spremenjeno klinično stanje pacienta lahko predvidevamo pri naslednjih vrednostih kreatinina (ob predhodno izmerjeni koncentraciji 100 µmol/L):

Ricosova baza podatkov (Jaffejeva metoda): kreatinin <82, >122 µmol/L

EUBIVAS (Jaffejeva metoda): kreatinin <83, >121 µmol/L

EUBIVAS (encimska metoda): kreatinin <87, >115 µmol/L

MERILA AVTOVALIDACIJE

Izračun RCV lahko uporabimo tudi v druge namene, npr. kot merilo za delta-check pri avtovalidaciji rezultatov, predvsem z namenom ugotavljanja zamenjave dveh vzorcev/pacientov ali primerljivosti meritev dveh vzorcev istega pacienta na dveh različnih analizatorjih. V tem primeru se kot faktor Z uporabljata vrednosti $Z=1,96$ za 95-odstotno oz. $Z=2,58$ za 99-odstotno verjetnost (bidirektni odnos dveh meritev):

$$RCV = 2^{1/2} \times Z \times [CV_a^2 + CV_i^2]^{1/2}$$

$$Z(95\%) = 1,96$$

$$Z(99\%) = 2,58$$

Z nižjimi vrednostmi RCV po študijah EUBIVAS dobivamo strožja merila avtovalidacije rezultatov.

ZAKLJUČEK

Študije EUBIVAS podajajo bolj natančne in zanesljive podatke o biološki variabilnosti analitov v evropski populaciji, kot smo jih imeli doslej. Zaradi tega lahko pričakujemo spremembe pri delu v medicinskih laboratorijih, predvsem pri postavljanju lastnih ciljev kakovosti.

LITERATURA

1. Desirable Biological Variation Database specifications; Desirable specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation. <http://www.westgard.com/biodatabase-2014-update.htm>
2. EFLM BIOLOGICAL VARIATION DATABASE <https://biologicalvariation.eu/>
3. Oosterhuls WP, et al. The use of error and uncertainty methods in the medical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(2):209-219.
4. CLSI standard EP7-A2 (Interference testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline – Second Edition).
5. Bartlett WA, Braga F, Carobene A, Coskun A, Prusa R, Fernandez-Calle P, Roraas T, Jonker N, Sandberg S, on behalf of the Biological Variation Working Group, European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). A checklist for critical appraisal of studies of biological variation. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53(6): 879-885.
6. Carobene A, on behalf of the EFLM Working Group on Biological Variation. The European Biological Variation Study (EuBIVAS): delivery of updated biological variation estimates, a project by the Working Group on Biological Variation in the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *J Lab Precis Med* 2017, Letter to the Editor.
7. Fraser CG. Biological variation: a rapidly evolving aspect of laboratory medicine. *J Lab Precis Med* 2017;2:35. Editorial.
8. Carobene A, Strollo M, Jonker N, Barla G, Bartlett WA, Sandberg S, Sylte MS, Roraas T, Solvik U, Fernandez-Calle P, Diaz-Garzon J, Tosato F, Plebani M, Coskun A, Serteser M, Unsal I, Ceriotti F, on behalf of the Biological Variation Working Group, European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Sample collections from healthy volunteers for biological variation estimates'update: a new project undertaken by the Working Group on Biological Variation established by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54(10): 1599-1608.
9. Aarsand A, Diaz-Garzon J, Fernandez-Calle P, Guerra E, Locatelli M, Bartlett WA, Sandberg S, Roraas T, Ceriotti F, Solvik U, Sylte MS, Coskun A, Serteser M, Unsal I, Tosato F, Plebani M, Jonker N, Barla G, Carobene A, on behalf of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Biological Variation Working Group. The EuBIVAS: Within- and Between-subject Biological Variation Data for Electrolytes, Lipids, Urea, Uric Acid, Total Protein, Total Bilirubin, Direct Bilirubin, and Glucose. *Clinical Chemistry*; 64:9, 1380-1393 (2018).
10. Carobene A, Marino I, Coskun A, Serteser M, Unsal I, Guerra E, Bartlett WA, Sandberg S, Aarsand AK, Sylte MS, Roraas T, Solvik U, Fernandez-Calle P, Diaz-Garzon J, Tosato F, Plebani M, Jonker J, Barla G, Ceriotti F, on behalf of the European Biological Variation Study of the EFLM Working Group on Biological Variation. *Clinical Chemistry*, 63:9, 1527-1536 (2017).

Vpliv biološke variabilnosti na laboratorijsko diagnostiko avtoimunskih bolezni

Evgenija Homšak

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

UVOD

Pri pojavu avtoimunosti in razvoju avtoimunskih (AI) bolezni je značilen odklon/anomalija v imunskem odzivu, pri čemer se obrambni imunski sistem usmeri proti telesu lastnim sestavinam celic in tkiv na podoben način kot proti vdoru tujih antigenov. Pri tem sta vključena humoralni imunski odziv, s tvorbo značilnih avtoprotiteles in celični imunski odziv, s tvorbo citotoksičnih celic, ki vplivajo na nastanek avtoimunskih reakcij in razvoj raznolikih avtoimunskih bolezni (1). Danes smo priča široki paleti različnih AI bolezni: sistemske revmatske bolezni (revmatoidni artritis, sistemski lupus eritematosus (SLE), sistemska skleroza, polimiozitis, dermatomiozitis, ...), gastrointestinalne bolezni (celiakija, kronična vnetna črevesna bolezen), jetrne bolezni (avtoimunske hepatitise), vaskulitise, antifosfolipidni sindrom, kožne in nevrološke bolezni. Za njihovo odkrivanje in spremljanje poteka je ključnega pomena laboratorijska diagnostika, ki je zaradi narave diagnostičnih parametrov in metod, s katerimi jih določamo, zelo kompleksna. Temelji predvsem na določanju prisotnih avtoimunskih protiteles (Pt) v serumu bolnikov, obolelih za avtoimunskimi boleznimi (1, 2).

V naravi smo priča prepletanju dveh pomembnih pojavov: biološke raznolikosti (angl. »*Biological variation*«), ki opredeljuje raznolikost bitij, oseb in njihovih lastnosti ter značilnosti, pojavov bolezni in bolezenskih znakov (biokemijskih parametrov, Pt), ki pa so lahko različno prisotni in pogosti v določenem okolju ali pri bolnikih z določeno boleznijo. V slednjem primeru govorimo o biološki razpršenosti (angl. »*Biological variability*«).

Na določanje Pt imata pomemben vpliv oba pojava. Še posebej pomemben je vpliv biološke raznolikosti, tako analita (humanih Pt), kot metod določanja, ki so odvisne od biološke raznolikosti uporabljenih živalskih ali humanih celic/tkiv označevalnih Pt v testu. Dodaten vpliv na raznolikost rezultatov in pomanjkljivo/oteženo harmonizacijo testov določanja pa ima tudi subjektivna narava uporabljenih metod, ki so odvisne od individualnih sposobnosti/izkušensosti analitika pri vrednotenju rezultatov analiz (2).

BIOLOŠKA RAZNOLIKOST ANALITA

Biološka raznolikost Pt izvira iz raznolikega/specifičnega imunskega odziva na posamezne antigene (sestavine celic, tkiv) in nastanka različno specifičnih Pt pri posameznem bolniku. Le-ta je odvisna od bioloških značilnosti bolnika, ki tvori Pt (vpliv genetike, epigenetike), različne odzivnosti imunskega sistema na prisotne antigene (Ag), raznolikosti Ag strukture posameznih molekul/celic/tkiv glede

na prisotne različne in različno izražene epitope ter od vpliva zdravil in drugih bioloških dejavnikov na razvoj Pt (2, 3). Pri razvoju AI bolezni in tvorbi kompleksov Ag-Pt so zelo pomembne različne vezi (ionske, vodikove, hidrofobne, ...), ki omogočajo vzpostavitev stabilnega imunskega kompleksa, pri čemer se nastala Pt, odvisno od procesa razvoja tolerance in avtoimunosti, razlikujejo po svoji afi-

niteti do Ag (nizko in visoko afinitetna Pt). Pri tem se afiniteta in tudi specifičnost Pt (za določeno AI bolezen) večja s trajanjem izpostavljenosti imunskega sistema/odziva določenemu Ag. Na nastanek Pt pa močno vplivajo tudi različni aditivi, zdravila in drugi prisotni Ag, ki lahko z vezavo na lastne Ag ali s svojo prisotnostjo sprožijo ali močno modulirajo imunski odziv na prisotne ali pod njihovim vplivom spremenjene lastne Ag. Za vsak Ag je namreč značil-

no, da izraža različne epitope, ki pa so pri bolnikih lahko različno izraženi in tako vplivajo tudi na nastanek različnih/različno specifičnih Pt proti enakemu Ag (3–5). Tak primer so anti-Ro Pt, ki so lahko usmerjena proti Ro52 ali proti Ro60 Ag epitopu, pri čemer bolnik lahko tvori eno ali obe vrsti specifičnih Pt (5). Le-ta pa se lahko pojavljajo pri različnih boleznih, tudi v različnih, za posamezno bolezen značilnih kombinacijah (Slika 1).

BIOLOŠKA RAZNOLIKOST METOD

Biološka raznolikost metod se izraža z raznolikostjo uporabljenih antigenskih substratov (Ag) v testnem kompletu, ki so lahko različnega (živalskega ali humanega) izvora in nam služijo za določanje Pt s pomočjo različnih metod (indirektna imunofluorescenca (IIF), encimskoimunski test na trdnem nosilcu (ELISA), različne blot tehnike, western-blot, Multiplex/Luminex/Bioplex metode, ...) (2–5). Pri tem se izvor (različne živali druge ali iste vrste), priprava (uporaba različnih medijev celičnih kultur), izolacija, postopek nanašanja Ag in ustrezna validacija pridobljenih Ag močno razlikujejo med metodami in proizvajalci diagnostičnih testnih kompletov (2). Biološka raznolikost metod se kaže tudi v uporabi raznolikih sekundarnih označevalnih Pt*, ki so prav tako živalskega izvora (zajčja, ovčja, celične kulture). Razlikujejo se predvsem po avidnosti/afiniteti do primarnih humanih Pt (vezava Fab-Pt* na Fc fragment humanih Pt), kar je posledica biološke raznolikosti uporabljenih živali, ki ta Pt tvorijo in so v ta namen uporabljena (Slika 2).

Po tipu ločimo lahko IgA, IgG ali IgM sekundarna Pt*, odvisno od želene določitve humanih specifičnih Pt. Kakovost in avidnost uporabljenih označevalnih Pt* močno vplivata tudi na jakost signala merjenja (fluorescence ali razvoja absorbance), kar vpliva tudi na občutljivost metode. Stalni vir, kakovost ter proces pridobivanja Ag in sekundarnih Pt omogočajo ponovljivost metode/testa ter primerljivost dobljenih rezultatov, ki je ključna pri spremljanju kroničnih bolnikov in spremembah (aktivnosti) bolezenskega stanja.

Nenazadnje na raznolikost rezultatov lahko vpliva tudi biološka raznolikost oseb/analitikov, ki na osnovi različnih lastnih sposobnosti vrednotijo rezultate IIF. Z opazovanjem in prepoznavanjem značilnih vzorcev in jakosti fluorescence in ustvarjanjem lastnih mejnih vrednosti lahko vplivajo na različno subjektivno vrednotenje istega vzorca bolnika (2, 6).

VPLIV NA DIAGNOSTIČNO IN ANALITIČNO UČINKOVITOST PT IN METOD DOLOČANJA

Biološka raznolikost in razpršenost analita (Pt) v populaciji zdravih in bolnih pomembno vplivata na sposobnost/moč odkrivanja bolezenskih značilnosti – parametrov (Pt) oz. posamezne bolezni: na diagnostično občutljivost in specifičnost proučevanih Pt. Tako se lahko določeno specifično Pt pojavlja skoraj pri vseh bolnikih z določeno boleznijo (npr. anti-tTG pri celiakiji), kar kaže na visoko diagnostično občutljivost tega Pt; ne pa tudi pri zdravih ali pri bolnikih z drugimi sorodnimi (gastrointestinalnimi) boleznimi, kar kaže na visoko diagnostično specifičnost tega Pt kot di-

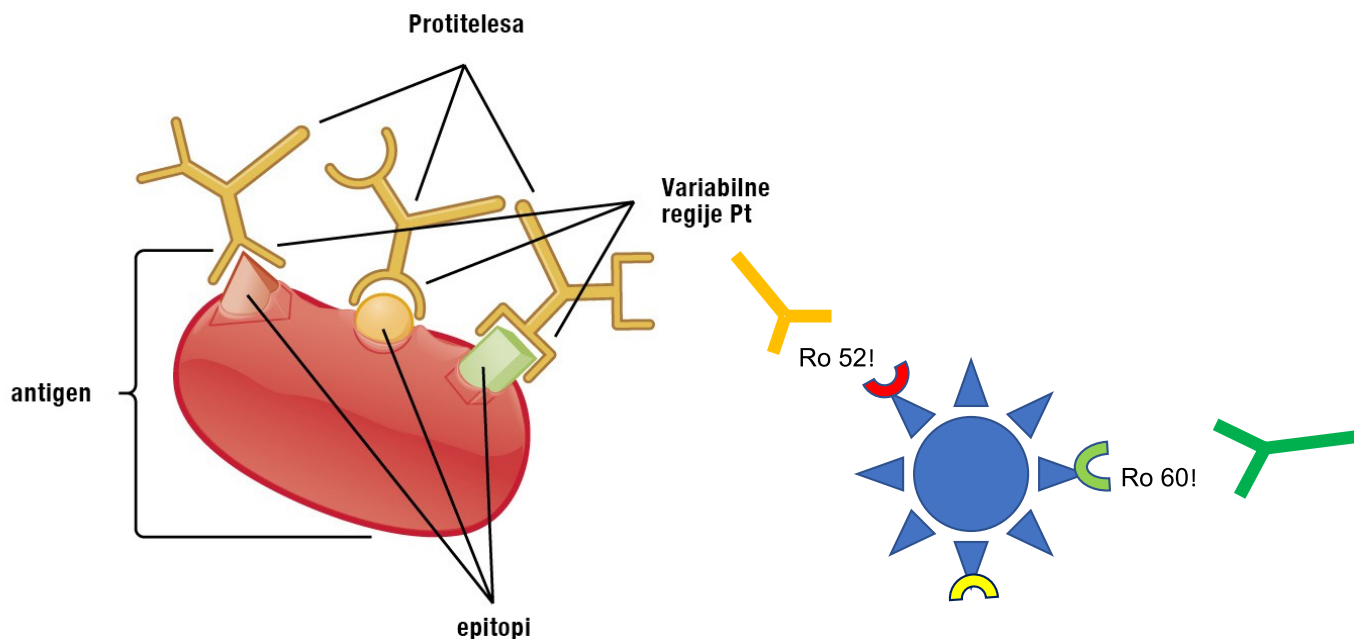
agnostičnega parametra. Zato je za ustrezno interpretacijo rezultatov nujno potrebno poznavanje diagnostične specifičnosti, občutljivosti, negativne in pozitivne napovedne vrednosti posameznih Pt, ki jih določamo z namenom odkrivanja ali spremljanja AI bolezni.

Raznolikost specifičnega imunskega odziva bolnika in v serumu prisotnih Pt, ki se lahko vežejo na različne antigene/epitope v testu/reagentu, pa je v neposredni povezavi z analitično občutljivostjo in specifičnostjo uporabljene me-

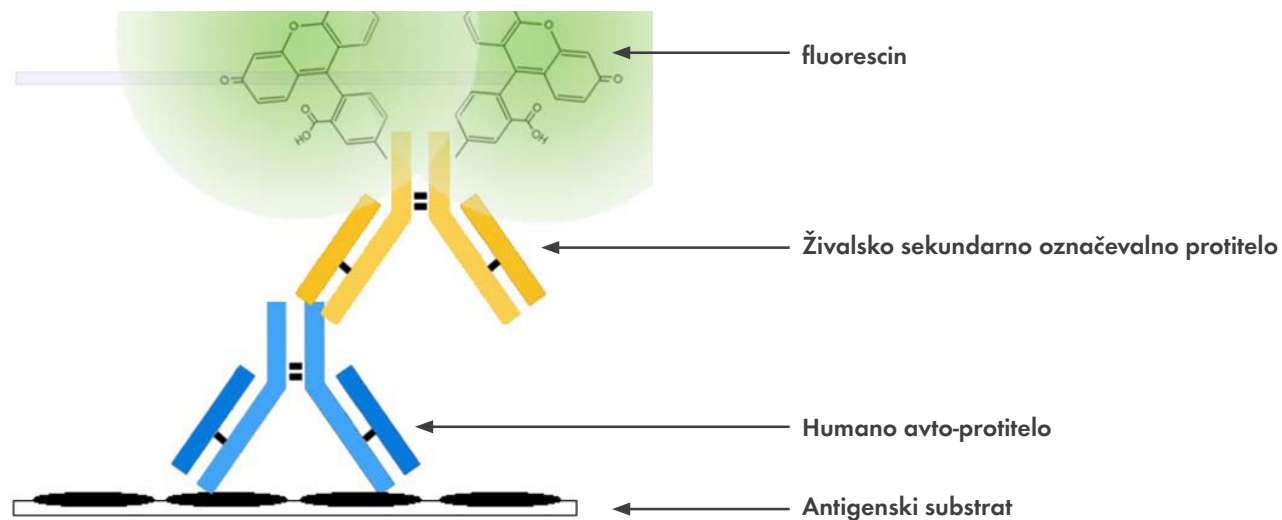
tode/testa, njihovo sposobnostjo določitve posameznih Pt. Le-ta je odvisna tudi od raznolikosti in značilnosti uporabljenih tkiv ali celic v reagentu/testu in njihove antigenske strukture. Tako lahko izbira živalskega/humanega tkiva ali celic, njihova priprava, izolacija, vezava v reagentnem testu (na objektu stekelca (IIF) ali na polistirenske ploščice (ELISA)) močno vpliva na to, ali se bo določeno specifično Pt, ki je prisotno v serumu, lahko vezalo na ustrezen Ag epitop, za katerega je specifično, in ki mora biti v testu na razpolago (biti izražen na površini). Tak primer so že omenjena Pt proti Ro antigenu, ki ima lahko izraženi dve podvrsti epitopov in proti katerim se lahko tvorijo tako anti-Ro 52 ali anti-Ro60 Pt (5). Za detekcijo obeh pa morata na reagentnem testu biti izražena oba Ag epitopa (Ro-52 in Ro-60) (Slika 3). Zato je za ustrezno določitev Pt in interpretacijo rezultatov nujno potrebno poznavanje metod in palete uporabljenih Ag (epitopov), ki omogočajo ustrezno vezavo in zaznavanje prisotnih Pt (6).

Na analitično občutljivost testa močno vpliva tudi uporaba ustreznih konjugatov – sekundarnih Pt* (živalskega izvora), ki so označena (s fluoresceinom ali encimom) in omogočajo ustrezno detekcijo analita (humanih specifičnih Pt). Od avidnosti/afinitete teh protiteles, ki se vežejo na primarni imunski kompleks (Ag-Pt)-Pt* z namenom označevanja in možnosti merjenja, je odvisna jakost fluorescence ali absorbance, ki omogoča ustrezno občutljivost zaznavanja in merjenja prisotnih Pt (analitična občutljivost testa) (Slika 2).

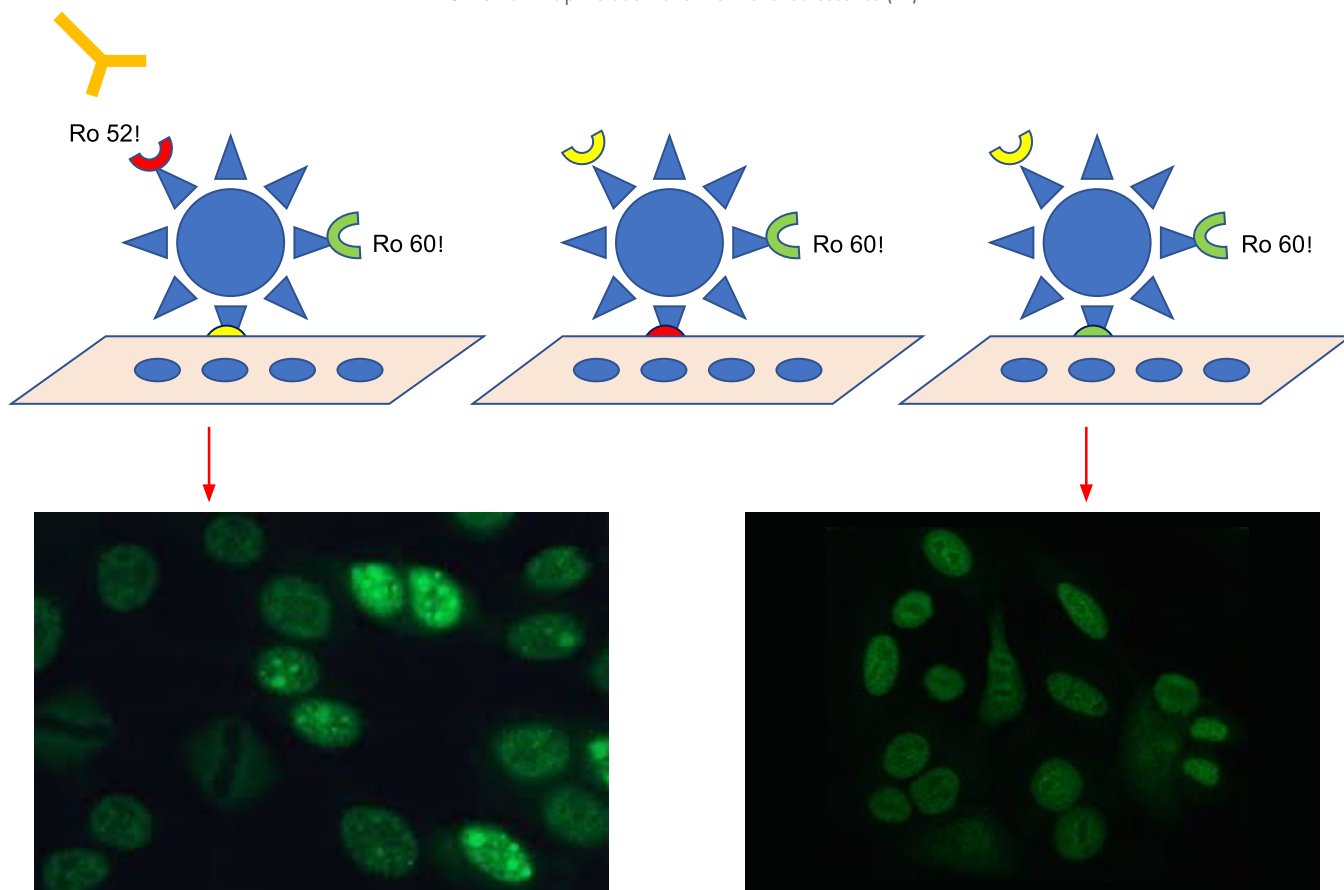
Analitična občutljivost metode IIF je odvisna tudi od uporabljenega mikroskopa in njegove kakovosti (občutljivosti in vira svetlobe) ter od uporabljenih začetnih razredčitev serumov (titrov), ki v stopenjski diagnostiki pri uporabi (Hep 2) testov kot začetnih presejalnih testov tudi pomembno vplivajo na nadaljno diagnostiko. Le-ta se namreč nadaljuje le, če je prisotna pozitivna fluorescenca z značilnim vzorcem (6).



Slika 1: Raznolikost tvorbe/prisotnih Pt proti različnim epitopom istega antigena (Ag)



Slika 2: Princip metode indirektna imunofluorescence (IIF)



Slika 3: Raznolikost uporabljenih antigenov (Ag) in njihovih epitopov v različnih testih IIF Svetlejša fluorescenca v preparatu Hep 2000 kaže na prisotnost anti-Ro-52 Pt

PROBLEM STANDARDIZACIJE IN HARMONIZACIJE METOD DOLOČANJA

Standardizacija in harmonizacija metod določanja Pt v diagnostiki AI bolezni sta zaradi omenjenih vplivov zelo težavni. Pomembno je standardizirati vse faze poteka diagnostike: predanalizno (vzorčenje), analizno (priprava testov) in poanalizno fazo (interpretacija, vrednotenje rezultatov) (2, 6). Največji problem še zmeraj predstavlja analizna faza, ki v tovrstni diagnostiki pogosto poteka stopenjsko in je za potrditev prisotnosti določenega Pt lahko sestavljena tudi iz več analiz in uporabljenih različnih testov. Pri tem se določeni testi uporabljajo kot presejalni ali kot potrditveni.

V tovrstni diagnostiki nimamo referenčnih metod, ki bi omogočale osnovo/standard za doseganje primerljivosti zelo raznolikih testov na tržišču. Metode so med seboj primerljive le po kvalitativnih merilih, torej po sposobnosti opredeliti vzorec kot pozitiven ali negativen na prisotna določena specifična Pt. Metode (ELISA, imunokemijske metode) pa niso primerljive po absolutnih vrednostih prisotnih koncentracij Pt, saj uporabljajo za umerjanje različne (vire) kalibratorje, ki niso med seboj primerljivi in sledljivi. Pogosto niso primerljivi tudi vzorci – tipi IIF za določitev ANA (Pt proti znotraj jedrnim antigenom) istega serumskega vzorca ob uporabi različnih testov (različnih proizvajalcev) s Hep-2 celicami. Tudi v shemah zunanjih kontrol določanja (UK-NEQAS, Rfb) se ustreznost rezultatov v večini primerov vrednoti le na osnovi prisotnosti/odsotnosti Pt v danem vzorcu. Pri tem se ciljne vrednosti in prisotnost posameznih Pt v kontrolnem vzorcu določijo na osnovi »konsenzusa – dogovora« več referenčnih laboratorijev, ki uporabljajo različne metode določanja.

Zaradi omenjenih vplivov in razlogov težavne priprave primarnih standardov (molekul antigenov), ki služijo kot osnova v diagnostičnih kompletih in so zaradi živalskega izvora izpostavljeni veliki biološki raznolikosti, je bilo v preteklosti veliko neuspešnih poskusov njihove priprave. Težave izhajajo tudi iz slabe stabilnosti pridobljenih potencialnih primarnih standardov. Šele v zadnjem času je pod vodstvom komisije za harmonizacijo AI testov pri Svetovnem združenju za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (*Joanna Sheldon: IFCC committee on harmonization of autoantibody testing*) prvič uspel poskus priprave dveh primarnih standardov, ki izkazujejo tudi ustrezno stabilnost (6). Leta 2015 so uspeli pripraviti primarni standard za mieloperoksidazo (MPO) (ERM-DA 476/IFCC) in leta 2017 za proteinazo-3 (PR-3) (ERM-DA483/IFCC), ki sta pomembna antigena za določitev Pt pri diagnostiki sistemskih vaskulitisov (7). Na osnovi teh standardov in ob upoštevanju korekcijskih faktorjev so v pilotskem projektu uspeli poenotiti kvantitativne rezultate testov sodelujočih proizvajalcev (7). Vendar je pot do aplikativne uporabe in implementacije teh standardov pri vseh na tržišču prisotnih proizvajalcih teh testov še zelo dolga in zapletena.

Harmonizacijo metod skušajo doseči tudi na področju poanalizne faze, s priporočili za vrednotenje vzorcev IIF in samih protokolov diagnostike, ki zajemajo tudi vrstni red uporabljenih testov v stopenjski diagnostiki (1, 2, 6–8). Prav tako so dana priporočila za uporabo poenotene nomenklature in prevedbe iz že uporabljene ICAP v AC (0-29) nomenklature za ločevanje in opredelitev prisotnih vzorcev IIF ob uporabi preparata Hep-2 (8).

ZAKLJUČEK

Laboratorijska diagnostika AI bolezni je zelo kompleksna. Velika pestrost dostopnih metod in testov, raznoliki pristopi določanja Pt ter številni vplivi biološke raznolikosti in razpršenosti tako na analit (Pt) kot na kreiranje metod/testov določanja so razlogi velikega problema standardizacije in harmonizacije tovrstne diagnostike in s tem zagotavljanja točnosti, ponovljivosti in primerljivosti rezultatov analiz, dobljenih z različnimi testi.

Zelo pomembna ni le izbira ustreznih testov/metod, temveč tudi izkušnost strokovnjakov; specialistov, ki vodijo stopenjsko diagnostiko in vrednotijo rezultate, kot tehnikov, ki izvajajo analize. Ob tem se je s poznavanjem metod in testov treba zavedati tudi njihovih omejitev ter pasti tovrstne diagnostike, da se zagotovijo dovolj ustrezni in zaupanja vredni rezultati, ki so pomemben dejavnik in v pomoč kliniku za opredelitev in spremljanje AI bolezni.

LITERATURA

1. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014;73:17–23. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203863
2. Meroni PL, et al. Standardization of autoantibody testing: a paradigm for serology in rheumatic diseases *Nat Rev Rheumatol* 2014;10:35–43. doi:10.1038/nrrheum.2013.180
3. Silva F, Hummel AM, Jenne DE, Specks U. Discrimination and variable impact of ANCA binding to different surface epitopes on proteinase 3, the Wegener's autoantigen. *J. Autoimmun* 2010;35:299–308.
4. Mahler M & Fritzler MJ. Epitope specificity and significance in systemic autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci* 2010;1183: 267–287.
5. Wolin SL & Reinisch KM. The Ro 60 kDa autoantigen comes into focus: interpreting epitope mapping experiments on the basis of structure. *Autoimmun Rev* 2006; 5:367–372.
6. Harmonisation of Autoantibody Tests (WG-HAT). International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine [online], <http://www.ifcc.org/ifcc-scientific-division/sd-working-groups/harmonisation-of-autoantibody-tests-wg-hat> (2013).
7. Hutu et al. First steps in the standardization of immunoglobulin IgG myeloperoxidase-anti-neutrophil cytoplasmic antibody measurements. *Clinical & Experimental Immunology* 2015; 183: 193–205. doi:10.1111/cei.12707.
8. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG et al. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody Hep-2 cell patterns 2014-2015. *Front Immunol* 2015;6:412. doi:10.3389/fimmu.201500412

Podvrste limfocitov v periferni krvi in punktatih bezgavk pri različnih starostih

Aleš Goropevšek

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

Limfociti izražajo na svojih površinah številne molekule in s pomočjo protiteles, usmerjenih proti tem površinskim antigenom, lahko prepoznavamo njihove podvrste (subpopulacije), kar imenujemo imunofenotipizacija. Monoklonska protitelesa, ki omogočajo prikazovanje istega antigena, so zbrana v skupine CD (Cluster of Differentiation). Pretočni citometri, ki analizirajo celice na osnovi oddane fluorescence takšnih vezanih protiteles, so se v času pandemije HIV preselili iz raziskovalnih tudi v diagnostične laboratorije. Določanje CD4 T-limfocitov je postalo najpomembnejše orodje za ocenjevanje napredovanja bolezni, verjetnosti oportunističnih okužb in učinkovitosti zdravljenja. Poleg T-pomagalk se od osnovnih limfocitnih subpopulacij s pretočno citometrijo določa še T-celice zaviralke, celice naravne ubijalke (NK-celice) in B-limfociti v periferni krvi, kar nekateri poenostavljeno imenujejo »imunski status«. Takšne analize so pomembne predvsem za opredelitev prirojenih in pridobljenih imunskih pomanjkljivosti, pri katerih prihaja do močno spremenjenih razmerij med osnovnimi limfocitnimi vrstami.

Z razvojem citometrije se je spreminjal tudi naš pogled na imunski sistem. V osemdesetih letih prejšnjega stoletja so lahko določali največ šest celičnih parametrov in opredelili omenjene osnovne populacije limfocitov. Tehnološki napredek z večanjem števila hkrati določenih antigenov na celicah (1) je kmalu omogočil analizo že v periferni krvi več kot 100 fenotipsko in funkcionalno različnih subpopulacij limfocitov. Opredelitev podvrst limfocitov s pretočno citometrijo je pomenila osnovo tudi za razumevanje sistemskih avtoimunskih bolezni. Te so še vedno zdravljene večinoma z nespecifično imunosupresijo (kortikosteroidi, citostatiki), ki s seboj prinaša številne stranske učinke in resne zaplete. Poleg tega pogosto nimajo zanesljivih laboratorijskih kazalcev aktivnosti bolezni.

S pretočno citometrijo je možno opredeliti in nato spremljati tudi redke populacije celic, ki pa so bistvene v patogenezi bolezni. Takšni celični parametri so pogosto boljše kazalci aktivnosti bolezni kot obstoječi laboratorijski in

klinični kazalci (2). Razen patogenih podvrst limfocitov je pomembno nedavno odkrite potencialno terapevtskih regulatornih T-limfocitov (Treg). Za Treg, ki izražajo značilni transkripcijski faktor FOXP3 in so normalno zastopane le v 5 do 10 % med CD4 T-limfociti v periferni krvi, so dokazali, da in vivo zavirajo avtoimunske odzive (3), in vitro pa proliferacijo in citokinsko produkcijo v patogenih – efektorskih T-limfocitih (4).

V svojem raziskovalnem delu smo ugotovili razlike celo v subpopulacijah Treg pri bolnikih s sistemskim lupus eritematosusom (SLE), ki jih lahko na osnovi številčne koncentracije t. i. aktiviranih regulatornih T-limfocitov (aTreg) v periferni krvi razdelimo v dve skupini (5). Najdbe iz temeljnih raziskav smo primerjali s kliničnimi kazalci aktivnosti, teže in dolgoročnega izida bolezni. V omenjeni in kasnejših raziskavah so bile znižane koncentracije aTreg in spremembe v znotrajcelični STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) signalizacije v periferni krvi bolnikov, s SLE močno povezane s pogostostjo novih zagonov bolezni in v korelaciji z ostalimi znanimi posrednimi kazalci za spremljanje teže bolezni (5–7).

Pri otrocih je SLE v povprečju težje potekajoča bolezen in je povezan z več organskimi okvarami. Do zgodnejšega pojavljanja bolezni lahko pride zaradi izrazitejših genetskih ali drugih neugodnih dejavnikov za razvoj bolezni, ki pa še vedno niso povsem razjasnjeni.

Povezovanje v skupnih raziskovalnih projektih nam je omogočilo spremljanje limfocitnih populacij pri bolnikih v različnih starostnih skupinah, od otrok, ki se zdravijo na Pediatrični kliniki v Ljubljani, do odraslih, ki se zdravijo v UKC Maribor.

V prvi skupni publikaciji v sodelovanju tudi z Inštitutom za mikrobiologijo in imunologijo so bile opisane tudi razlike med subpopulacijami Treg v periferni krvi zdravih preiskovancev v različnih starostnih skupinah (8).

Z večanjem števila hkrati določenih parametrov pri analizi redkih populacij limfocitov postaja ob biološki raznolikosti pomemben dejavnik t. i. tehnična raznolikost.

Nedavna študija, v kateri so avtorji slednjo skušali kontrolirati tudi z uporabo računalniških algoritmov pri zamejevanju celic, je pokazala razmeroma majhno intra individualno raznolikost skozi čas za večino določenih limfocitnih subpopulacij.

Ugotovili so pomemben vpliv starosti, ne pa tudi spola, na frekvenco številnih populacij v periferni krvi, z drastičnim zmanjšanjem naivnih T-limfocitov pri starejših donorjih (9).

S starostjo se po drugi strani večja pogostnost novotvorb – klonskih sprememb limfocitov. Klon maligno spremenjenih celic po antigenih značilnostih spominja na subpopulacijo limfocitov, iz katere je nastal. Tako imajo maligni limfomi antigenske značilnosti zrelih, večinoma B-limfocitov.

Tako kot v histologiji je tudi v citopatologiji zanesljiva diagnoza limfomov možna le na osnovi kliničnih podatkov, mikroskopskega pregleda celičnega vzorca ter dodatnih imunofenotipskih in molekularno-bioloških analiz. Kot je navedeno v Smernicah za obravnavo bolnikov z malignimi limfomi Onkološkega inštituta, mikroskopski pregled celičnega vzorca danes ne zadošča niti za zanesljivo razlikovanje med reaktivnimi limfocitnimi proliferacijami in limfomom, niti za klasificiranje limfomov. Zato je rutinska uporaba dodatnih imunofenotipskih analiz, ki jih praviloma napravimo s pretočnim citometrom, obvezna (10).

Pri svojem diagnostičnem delu opazamo s starostjo povezane razlike v limfocitnih populacijah tudi v vzorcih punktativnih bezgavk, v katerih restrikcije lahkih verig imunoglobulinov, ki bi bila znak za celice malignega B-limfoma, s pretočno citometrijo nismo ugotovili.

LITERATURA

1. De Rosa SC, Brenchley JM, Roederer M. Beyond six colors: A new era in flow cytometry. *Nat Med* 2003;9:112-7.
2. Illei GG, Tackey E, Lapteva L, Lipsky PE. Biomarkers in systemic lupus erythematosus. II. Markers of disease activity. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2048–65.
3. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 775-87
4. Thornton AM, Shevach EM. CD4+ CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998; 188: 287–96.
5. Goropevšek A, Gorenjak M, Gradišnik S, Dai K, Holc I, Hojs R, Krajnc I, Pahor A, Avčin T. Increased Levels of STAT1 Protein in Blood CD4 T Cells from Systemic Lupus Erythematosus Patients Are Associated with Perturbed Homeostasis of Activated CD45RA(-)FOXP3(hi) Regulatory Subset and Follow-Up Disease Severity. *J Interferon Cytokine Res*. 2017;37:254-268.
6. Goropevšek A, Gorenjak M, Gradišnik S, Dai K, Holc I, Hojs R, Krajnc I, Pahor A, Avčin T. STAT5 phosphorylation in CD4 T cells from patients with SLE is related to changes in their subsets and follow-up disease severity. *J Leukoc Biol*. 2017;101:1405-1418.
7. Goropevšek A, Holcar M, Pahor A, Avčin T. STAT signaling as a marker of SLE disease severity and implications for clinical therapy. *Autoimmun Rev*. 2019;18:144-154.
8. Holcar M, Goropevšek A, Ihan A, Avčin T. Age-Related Differences in Percentages of Regulatory and Effector T Lymphocytes and Their Subsets in Healthy Individuals and Characteristic STAT1/STAT5 Signalling Response in Helper T Lymphocytes. *J Immunol Res*. 2015;2015:352934.
9. Burel JG, Qian Y, Lindestam Arlehamn C, Weiskopf D, Zapardiel-Gonzalo J, Taplitz R, Gilman RH, Saito M, de Silva AD, Vijayanand P, Scheuermann RH, Sette A, Peters B. An Integrated Workflow To Assess Technical and Biological Variability of Cell Population Frequencies in Human Peripheral Blood by Flow Cytometry. *J Immunol*. 2017 15;198:1748-1758.
10. Jezeršek Novaković, B., Gašljević, G., Jagodic, M., Južnič Šetina, T., Pahole Goličnik, J., Kloboves-Prevodnik, V., Skoblar Vidmar, M., Smrdel, U., Štrbac, D., & Zadravec-Zaletel, L. (2018). Recommendations for the treatment of patients with malignant lymphomas. *Onkologija: A Medical-Scientific Journal*, 22(1), 74-94.

Določanje prostih lahkih verig imunoglobulinov v likvorju

Evgenija Modrič

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

Multipla skleroza (MS) je kronična, avtoimunska, vnetna, demielinizacijska ter degenerativna bolezen osrednjega živčevja. Vzrok za MS še ni znan, bolezen je genetsko vezana, vendar ne dedna. Vplivi okolja najverjetneje sprožijo avtoimunski odziv proti mielinskim ovojnica nevronov, kar povzroči okvaro celic in njihov propad. Število obolelih za MS je večje v severnih deželah, vzroka sta manjša izpostavljenost soncu in nižje koncentracije vitamina D v serumu. Najpogostejše zbolijo osebe med 20. in 40. letom starosti, ženske zbolijo dvakrat pogostejše kot moški (razmerje 2,3 : 1). Največja pojavnost bolezni je v Evropi in Severni Ameriki, v ZDA so leta 2019 našteali več kot 400 obolelih na 100000 prebivalcev, v Sloveniji ocenjujemo število obolelih na več kot 2500.

Klinični znaki so različni, zato MS imenujemo bolezen tisočerih obrazov. Povzročajo jih okvare enega ali več sistemov v osrednjem živčevju: optične motnje, hemipareza, blage kognitivne motnje, motnje koordinacije, motnje razpoloženja, utrujenost, sfinkterske motnje. Glede na potek bolezni poznamo več oblik (recidivno-reminetna, sekundarno napredujoča, primarno napredujoča), razlikujejo se po obliki in trajanju zagonov ter oceni izida bolezni.

Za diagnozo in potek bolezni je pomembna značilna prostorska in časovna razpršenost sprememb v belini osrednjega živčevja, kar pomeni ponavljanje lezij in večanje njihovega števila. Diagnoza temelji na klinični oceni, slikovni diagnostiki (magnetna resonanca detekcije lezij) in analizi likvorja lumbalne punkcije. McDonałdova merila iz leta 2017 priporočajo določanje oligoklonalnih trakov IgG v likvorju tudi pri klinično izoliranem sindromu (en sam zagon bolezni), pri čemer pozitiven rezultat skupaj s kliničnimi znaki potrjuje diagnozo multiple skleroze. Pri domnevni multipli sklerozi zato kvantitativno ocenjujemo intratekal-

no sintezo imunoglobulinov G v likvorju ter kvalitativno določamo oligoklonalne IgG v likvorju in serumu. V našem laboratoriju rutinsko določamo koncentracijo IgG v likvorju in serumu ter koncentracijo albumina v likvorju in serumu, ki morata biti odvzeta v razmaku največ dveh ur. Izračunamo Qalb (kvocient med koncentracijo albumina v likvorju in serumu) in QIgG (kvocient med koncentracijo IgG v likvorju in serumu) ter podamo rezultate v obliki Reiberjevega diagrama. Sintezo oligoklonalnih IgG v likvorju določamo z izoelektrofokusinganjem. Prisotnost oligoklonalnih IgG ima visoko občutljivost in specifičnost (97 % in 94 %), zato je preiskava našla svoje mesto v priporočilih algoritma diagnostike MS. Uporablja se kot napovednik prehoda iz klinično izoliranega sindroma v multipla sklerozo in nadomešča razpršenost v času pri dokončni diagnozi. Metoda določanja oligoklonalnih trakov imunoglobulinov G v likvorju je zahtevna in dolgotrajna, interpretacija rezultatov pa subjektivna ter kvalitativna. Določanje prostih lahkih verig imunoglobulinov v likvorju je avtomatizirana, standardizirana, kvantitativna metoda, ki je v številnih študijah pokazala primerljivo specifičnost in občutljivost metodi določanja oligoklonalnih IgG. Rezultati primerjav obeh metod iz literature kažejo, da bi določanje prostih lahkih verig kapa v likvorju in serumu ter kvocient med njima, lahko nadomestilo določanje oligoklonalnih trakov IgG. Določili smo oligoklonalne IgG in kapa proste lahke verige v likvorju in serumu 104 preiskovancev z domnevno MS. Izračunana specifičnost in občutljivost (93 % in 86 %) sta bili primerljivi s podatki iz literature, vendar ne bistveno večji od oligoklonalnih IgG. Zaenkrat ostaja določanje oligoklonalnih imunoglobulinov G v likvorju zlati standard za oceno intratekalne sinteze imunoglobulinov, značilne za MS.

LITERATURA

1. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 2018;17:162-73
2. Presslauer S, Milosavljević D, Brucke T, Bayer P, Huebl W. Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol* 2008;255:1508-14
3. Presslauer S, Milosavljević D, Huebl W, Aboulenein-Djamshidian F, Krugluger W, Deisenhammer F, et al. Validation of kappa free light chains as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: a multicenter study. *Mult scler* 2016;22:502-10
4. Christiansen M, Carsten Gjelstrup M, Stilund M, Christensen T, Petersen T, Møller HJ. Cerebrospinal fluid free kappa index perform equal to oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(2): 210-220

Optimizacija/racionalizacija naročanja laboratorijskih preiskav

Maksimiljan Gorenjak

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

Optimalno naročanje je najboljšje v danih okoliščinah. Je v skladu s strokovnimi smernicami, v sodelovanju z laboratorijskimi strokovnjaki in v največjo korist bolniku. Pojem racionalno ima v praksi vedno nekoliko slab prizvok in običajno pomeni manj, v primeru naročanja laboratorijskih preiskav pa selektivno naročanje tistih preiskav, ki so za obravnavo bolnika potrebne, ne povzročajo pretirane obremenitve laboratorija, niso povezane z visokimi finančnimi vložki in ne predstavljajo novega tveganja za bolnika. Laboratorijski stroški običajno ne presegajo 5 % vseh sredstev, ki se porabijo v zdravstvene namene. Kljub temu večina odločitev zdravnikov temelji na laboratorijskih podatkih. Vpogledi zdravnikov v pacientove podatke (medicinski informacijski sistem) so po nekaterih študijah v 94 % vezani prav na storitve laboratorijev.

Zakaj zdravnik naroči preiskave in kako to vpliva na njegovo odločanje je vprašanje, ki več kot 30 let buri duhove na medicinskem in laboratorijskem področju. »Brain to brain« zanka, ki povezuje celovito pot odločanja od zamisli do reakcije, je ostala v vseh letih od nastanka bolj ali manj nespremenjena (Lundberg, 1981). Prav tako tudi opazanja laboratorijskih delavcev, ki smo deležniki v procesu naročanja in izvajanja preiskav. Skupen zaključek, ki prevladuje v večini študij je, da število preiskav narašča nesorazmerno s številom bolnikov. To ne gre le na račun novih storitev, pač pa na račun večjega števila ponovitev oz. na račun neracionalnega naročanja.

M. Laposata tako ugotavlja, da je treba posvetiti pozornost predvsem izobraževanju zdravnikov. Pri tem izpostavlja, da kurikulum večine ameriških medicinskih fakultet vsebuje vsaj 100 ur anatomije in le 9 % jih ima ločeno tematiko laboratorijske medicine. Pri tistih, ki jo imajo, znaša kvota ur le okrog 10, za mnoge le 5 ur v celotnem izobraževalnem procesu. Za transfuzijsko medicino navaja podatek, da ima večina fakultet za to namenjeni le 2 uri programa. Drugi avtorji navajajo kot možnost izboljšanja uporabe laboratorijskih storitev še harmonizacijo nomenklature (katalogi

preiskav), harmonizacijo profilov preiskav, računalniško naročanje profilov (CPOE), blokiranje določenih naročil in informiranje naročnikov o stroških laboratorijskih preiskav.

Kljub obetavnim aktivnostim in ukrepom se ni mogoče izogniti sklepu, da se bo trend naročanja preiskav ohranil. Laboratorijski delavci se moramo torej ukvarjati predvsem s tehničnimi možnostmi, ki bodo pripeljale do boljše storilnosti laboratorijev. Ključna rešitev je zagotovo avtomatizacija procesov, ki omogoča večjo storilnost pri manjši obremenitvi zaposlenih. S tem se zmanjša pritisk na zaposlene, ki lahko opravljajo zahtevnejša strokovna dela, skrbijo za vzgajanje kadrov in mentorstva ter sodelovanju z naročniki (interpretacija rezultatov).

Po letu 2010 opazamo izreden porast števila strokovnih prispevkov, ki so povezani z razvojem umetne inteligence (AI). Izraz umetna inteligenca se nanaša na zapleteno programsko opremo (software), ki omogoča računalnikom, da podpirajo ali celo posnemajo človeški razum in sposobnost odločanja. Opisuje sposobnost strojev, da kažejo razumno obnašanje. Algoritmi umetne inteligence lahko izražajo neprilagodljive (temelječe na pravilih) in prilagodljive lastnosti (učenje strojev). Laboratorijski delavci smo se srečali z umetno inteligenco med prvimi na področju medicinskih strok predvsem po zaslugi programske opreme, ki omogoča spremljanje rezultatov laboratorijskih preiskav pri posamezniku za nazaj. Laboratorijski informacijski sistemi so že pred leti omogočali enostavne primerjave rezultatov na osnovi absolutne razlike vrednosti (delta check), danes pa premorejo že prave lastnosti umetne inteligence. Pri izvajanju laboratorijskih preiskav (analitika) obstajata trenutno le dva sistema, ki imata odobritev FDA, in sicer Cellavision DM 96 (Cellavision, Lund, Švedska) in Accelerate Pheno (Accelerate, Tucson, ZDA). Prvi sistem je tudi našim laboratorijem dobro znan in predstavlja slikovno prepoznavanje celic krvi, s tem, da jih razvršča v posamezne skupine. V bistvu predstavlja sistem Cellavision mikroskop, ki ga vodi algoritem programske opreme. Drug sistem je

manj poznan in je s področja klinične mikrobiologije. Predstavlja avtomatizirano napravo, ki je sposobna prepoznati patogene mikroorganizme iz različnih kultur. Pri tem uporablja lastnosti pretočne citometrije, tehnologije FISH in slikovno analizo.

Veliko novosti je pri tistih dejavnostih, ki so na področju slikovne diagnostike odvisne od ljudi. Odčitavanje slik (MR, CT) ni več samo domena zdravnikov, saj jih uspešno nadomešča umetna inteligenca. Po nekaterih študijah (Harvard/MIT eksperiment 2016) je uspešnost umetne inteligence povsem primerljiva, po nekaterih drugih pa celo boljša.

Umetna inteligenca je vključena tudi v razvoj novih metod, ki lahko določajo/računajo klasične laboratorijske parametre brez odvzema krvi. Ena takih novosti je določanje koncentracije kalijevih ionov v krvi na osnovi elektrokardiograma (EKG). Za to je potreben primeren telefon ali elektronska ura, ki je z EKG elektrodami povezana z bolnikom. Primerna aplikacija (apps) pretvarja podatke iz EKG-ja v koncentracijo kalijevih ionov na osnovi kompleksnega algoritma, ki je nastal na osnovi ogromnega števila posnetih EKG-jev in določitev koncentracij kalija v krvi. Sistem so razvili strokovnjaki klinike Mayo in podjetja AliveCor.

LITERATURA

1. Lundberg DG. Acting on significant laboratory results. *JAMA* 1981;245:1762-3.
2. Smellie WSA. Demand management and test request rationalization. *Ann Clin Biochem* 2012; 49:323-336.
3. Plebani M, Laposata M, Lundberg DG. The brain-to-brain loop concepts for laboratory testing 40 years after its introduction. *Am J Clin Pathol*.2011;136:829-833.
4. Danielle B Freedman. Towards better test utilization-strategies to improve physician ordering and their impact on patient outcomes. *eJIFCC2015Vol-26No1pp015-030*
5. <https://www.cnn.com/2018/09/10/alivecor-gets-fda-breakthrough-status-for-bloodless-hyperkalemia-test.html>

03

Obravnavava
bolnikov z rakom
na sistemskem
zdravljenju in
z zmanjšanim
delovanjem
ledvic

Uporaba enačbe »New model« za oceno glomerulne filtracije pri bolnikih z rakom

Barbara Možina

Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za laboratorijske dejavnosti, Ljubljana, Slovenija

Glomerulna filtracija (GF) je merilo ledvične funkcije, filtracijske sposobnosti vseh nefronov.

GF je spremenjena še pred pojavom prvih kliničnih znakov bolezni. Lahko jo ocenjujemo z merjenjem serumskega kreatinina, očistki ali z napovednimi formulami. Spreminja se s starostjo (zmanjšuje za 0,8 ml/min do 1 ml/min letno), v času dneva je vrednost GF različna: popoldan je za 10 % višja kot ponoči. Poveča se po zaužitju beljakovin, prehodno pa se zmanjša med telesnim naporom, odvisna je od spola in telesne površine.

Citotoksične učinkovine (npr.: cisplatin, karboplatin, visokodozni metotreksat, etopozid, topotecan, aminoglikozidni antibiotiki), ki se izločajo skozi ledvice, so nefrotoksične. Oslabljen ledvična funkcija vpliva na odstranjevanje zdravil in vodi do okvare glomerulov in tubulov, do akutnih in kroničnih okvar ledvic. Nefrotoksično delovanje citostatika ojačajo dehidracija, predhodne bolezni ledvic, starost bolnika ter sočasna uporaba drugih nefrotoksičnih zdravil. Poslabšanje delovanja ledvic lahko pričakujemo tudi zaradi razpada tumorja.

Z odmerki karboplatina, izračunanimi z uporabo GF, se zdravijo bolniki z germinalnimi tumorji, rakom pljuč, dojke in jajčnikov, tako adjuvantno kot paliativno. Natančno odmerjanje je ključnega pomena za izid zdravljenja in toksičnost. Ocena ledvične funkcije pri bolnikih z rakom, pri katerih je indicirano zdravljenje s karboplatinom in/ali cisplatinom, z različnimi cilji zdravljenja, mora biti čim bolj točna, da bi se izognili bodisi premalo učinkovitemu zdravljenju ali/in pomembnejšim neželenim učinkom zdravljenja s sistemsko kemoterapijo.

Ocena GF je pogosto nujna in bistvena za odmerjanje karboplatina za kemoterapijo.

Pred aplikacijo citostatika vedno ocenjujemo glomerulno filtracijo. Toksičnost citostatikov je odvisna od velikosti odmerka in stopnje diureze. Zmanjšano delovanje glomerulov ima za posledico zvišano plazemsko koncentracijo citostatika, kar povzroči večje okvare tubulov.

Toksičen vpliv lahko zmanjšamo z manjšim odmerkom (individualno odmerjanje) citostatika in hemodializo.

Referenčna metoda ocene ledvične funkcije, glomerulne filtracije (GF), je nuklearno medicinska metoda z radiofarmakom 51 krom-etilendiamin-tetraocetna kislina (^{51}Cr -EDTA), ki je zamudna in draga. Obstaja več neposrednih meritev GF na podlagi očistka.

Do pred nedavnim smo za oceno ledvične funkcije pri onkoloških bolnikih, ki so se zdravili s karboplatinom, uporabljali oceno GF z "Wrightovo formulo".

Konec avgusta 2017 je Janowitz T. s sodelavci v J Clin Oncol objavil članek "New Model for Estimating Glomerular Filtration Rate in Patients With Cancer". Avtorji so izvedli prospektivno kontrolirano študijo z zunanjo validacijo na več tisoč onkoloških bolnikih ter primerjali več vrst ocen ledvične funkcije (tudi Wrightove) z referenčno metodo. Izdelali so enačbo "Nov model", ki se je izkazala za najbolj zanesljivo za oceno ledvične funkcije (GF) pri bolnikih z rakom.

Priporočena je pri bolnikih s stabilno ledvično funkcijo, pri katerih je indicirano zdravljenje s karboplatinom in cisplatinom.

Ime formule	Formula
New Model - Janowitz	$\sqrt{\text{eGFR}} = \beta_0 + \beta_1 \text{starost} + \beta_2 \text{BSA} + \beta_3 \ln(\text{Cre}) + \beta_4 \ln(\text{Cre})^2 + \beta_5 \ln(\text{Cre})^3 + (\beta_6 + \beta_7 \text{starost}) \times \text{S} + \beta_8 \text{starost} \times \text{BSA}$ $\text{BSA} = 0,007184 \times \text{teža}^{0,425} \times \text{višina}^{0,725}$
Wrightova formula	$\text{eGFR (mL/min)} = \{[6580 - (38,8 \times \text{starost})] \times \text{BSA} \times [1 - (0,168 \times \text{spol})]\} / \text{SCr}$ $\text{BSA} = 0,007184 \times \text{teža}^{0,425} \times \text{višina}^{0,725}$
CKP-EPI	$\text{eGFR} = 14 \times \min(\text{SCr}/\kappa, 1)^a \times \max(\text{SCr}/\kappa, 1)^{-1,209} \times 0,993^{\text{Age}} \times 1,018 [\text{ž}] \times 1,159$
MDRD Study formula	$\text{eGFR (mL/min/1,73m}^2) = 175 \times (\text{SCr}/88,4)^{-1,154} \times (\text{starost})^{-0,203} \times (0,742 \text{ za } \text{ž})$
Cockcroft-Gaultjeva formula	$\text{CrCl (mL/min)} = \{(140 - \text{starost}) \times \text{wt} \times [1 - (0,15 \times \text{spol})]\} / (0,814 \times \text{SCr})$

V laboratoriju Onkološkega inštituta Ljubljana smo opravili evaluacijo metod in postopkov na 160 vzorcih onkoloških bolnikov. Za izračun »New model« smo uporabili enačbo, ki jo navajajo avtorji publikacije (JCO 2017, Janowitz et al.).

- Izračun »New model« daje povprečno –2 % (od –25 % do +20 %) nižje rezultate glede na izračun »CKD-EPI/BSA« (primerjava Bland-Altman).
- Izračun »New model«, ne glede na to ali kreatinin določamo z Jaffejevo ali encimsko metodo, kaže slabše ujemanje z izračunom »Wright« kot »CKD-EPI/BSA«. Sipanje rezultatov preko celotnega območja je značilno večje.
- Izračun »New model« daje povprečno –8 % (od –35 % do +20 %) nižje rezultate glede na izračun »Wright« (primerjava Bland-Altman).

- Izračun »CKD-EPI/BSE« kaže dobro ujemanje z izračunom »Wright« oziroma daje povprečno –5 % (od –20 % do +10 %) nižje rezultate (primerjava Bland-Altman), kar je sorodno ugotovitvam avtorjev omenjene publikacije (JCO 2017, Janowitz et al.).

Na osnovi naših spoznanj smo sklenili, da je trenutno za oceno ledvičnega delovanja oz. GF pri onkoloških bolnikih s stabilno ledvično funkcijo, pri katerih je indicirano zdravljenje s karboplatinom in cisplatinom, najbolj zanesljiva ocena po izračunavanju z »Novim modelom«. Zato predlagamo uvedbo omenjene metode na Onkološkem inštitutu, kakor tudi pri onkoloških bolnikih, ki se zdravijo izven OI v Sloveniji.

LITERATURA

1. Wright JG, Boddy AV, Highley M, Fenwick J, McGill A, Calvert AH.: Estimation of glomerular filtration rate in cancer patients, British Journal of Cancer 84(4); 2001: 452 – 459
2. Cockcroft DW, Gault MH: Prediction of creatinin clearance from serum creatinine, Nephron, 16; 1976: 31 - 41
3. Beumer JH, Inker LA, Levey AS. Improving Carboplatin Dosing Based on Estimated GFR. Am J Kidney Dis. 2018 Feb;71(2):163-165
4. Janowitz T, Williams EH, Marshall A, Ainsworth N, Thomas PB, Sammut SJ, Shepherd S, White J, Mark PB, Lynch AG, Jodrell DI, Tavaré S, Earl H. New Model for Estimating Glomerular Filtration Rate in Patients With Cancer. J Clin Oncol. 2017 Aug 20;35(24):2798-2805.

Protitrombotično zdravljenje ob sistemskem onkološkem zdravljenju – pogled farmacevta

Samo Rožman

Onkološki inštitut Ljubljana, Lekarna, Ljubljana, Slovenija

UVOD

Interakcija med zdravili pomeni spremembo farmakološkega ali kliničnega odziva na zdravilo zaradi sočasnega jemanja drugega zdravila. Pri tem pride do povečanja ali zmanjšanja terapevtskega učinka. Klinično pomembna interakcija pomeni spremenjeno učinkovitost in varnost v takšni meri, da je potrebna prilagoditev režima odmerjanja ali druga oblika intervencije. Izraz interakcija med zdravili ima dostikrat negativno konotacijo, kljub temu, da so določene interakcije med zdravili tudi zaželenе.

Klinično pomembne interakcije so zlasti pomembne pri zdravljenju z ozkim terapevtskim oknom. Dejavnike tveganja za pojav interakcij lahko razdelimo na tiste, ki so povezani z bolnikom (starost, spremljajoče bolezni, spremenjeno delovanje organov, samozdravljenje) in tiste, ki so povezani z zdravili (ozko terapevtsko okno, presnova preko citokroma P450, sočasna uporaba pospeševalcev ali zaviralcev citokroma P450, resni neželeni učinki). Incidenca interakcij med zdravili narašča s starostjo, največkrat zaradi večjega števila uporabljenih zdravil.

INTERAKCIJE MED ZDRAVILI

Farmakokinetične interakcije

Glede na mehanizem ločimo farmakokinetične in farmakodinamične interakcije med zdravili. Farmakokinetične so tiste na ravni procesov ADME (absorpcija, distribucija, metabolizem, eliminacija) in se merijo s spremembami farmakokinetičnih parametrov (razpolovni čas, površina pod krivuljo – AUC, maksimalna serumska koncentracija itn.).

Interakcije, ki spremenijo obseg absorpcije, so lahko posledica hrane in nekaterih zdravil. Nekatera zdravila je treba jemati na prazen želodec (npr. hrana poveča ali zmanjša AUC), pri nekaterih se svetuje jemanje z obrokom (npr. hrana zmanjša tveganja draženja prebavil), v nekaterih primerih pa hrana zmanjša obseg absorpcije, vendar je treba zdravilo kljub temu jemati s hrano, saj so bila tako opravljena klinična preizkušanja. Pri določenih zdravilih, tipični

predstavniki v onkologiji so nekateri zaviralci tirozinskih kinaz, je topnost zdravila odvisna od kislosti v želodčnem soku, torej lahko zdravila, ki zmanjšajo kislost v želodcu, zmanjšajo tudi absorpcijo. Interakcijam na ravni absorpcije se najlažje izognemo s prilagoditvijo obrokov in jemanjem zdravil pred obrokom ali po njem, občasno tudi z zamenjavo zdravila.

Distribucija oz. porazdelitev učinkovine do mesta delovanja je odvisna od krvnega pretoka in vezave učinkovine na plazemske proteine. Biološko aktivna se pojmuje nevezana učinkovina, saj vezava na proteine omejuje delovanje zdravila. Če sočasno apliciramo dve učinkovini z visoko afiniteto na plazemske proteine, bo tista z močnejšo vezavo izpodrinila drugo, kar spremeni serumsko koncentracijo biološko aktivne učinkovine. Do klinično pomembnih interakcij na ravni distribucije prihaja izjemno redko.

Najpogostejše so interakcije na ravni presnove, številna zdravila se namreč presnavljajo v jetrih. Najpomembnejši presnovni encimi so citokrom P450, skupina encimov s številnimi predstavniki, ki so odgovorni za presnovo največjega deleža zdravil. Poznamo različne zaviralce in pospeševalce citokromov P450, tako zdravila, kot tudi hrano, rastlinske pripravke, kajenje idr. Pospeševalec bo povečal presnovo aktivne učinkovine, kar povzroči nižje serumske koncentracije in tako manjši učinek. Nasprotno pa bo zaviralec zmanjšal presnovo aktivne učinkovine, kar povzroči višje serumske koncentracije in večji učinek. Če je upora-

bljeno zdravilo predzdravilo, je vpliv zaviralcev ali pospeševalcev ravno obraten. Predzdravilo je namreč neaktivna učinkovina, ki šele po presnovi postane farmakološko aktivna. V tem primeru pospeševalec poveča presnovo predzdravila v aktivno učinkovino, kar povzroči njene višje serumske koncentracije in s tem večji učinek.

Podobno kot pri distribuciji učinkovine, tudi na ravni eliminacije poznamo razmeroma malo klinično pomembnih interakcij.

FARMAKODINAMIČNE INTERAKCIJE

Pri farmakodinamičnih interakcijah gre za sočasno uporabo dveh ali več zdravil s sinergističnim, aditivnim ali antagonističnim delovanjem. V klinični praksi so farmakodinamične interakcije pogoste, učinke pa je načeloma možno predvideti.

O sinergističnih interakcijah govorimo, ko eno zdravilo poveča učinke drugega. Te so v klinični praksi zaželeni, razmeroma pogosti in uveljavljene. Več desetletij se sočasna uporaba več protitumornih zdravil hkrati (t. i. kemoterapijski protokol) uporablja za izboljšanje učinkovitosti zdravljenja pri različnih rakih. O antagonističnem delovanju govo-

rimo, ko eno zdravilo zmanjšuje učinkovitost drugega. V onkologiji je znan primer zaželeni antagonistične interakcije uporaba folinske kisline pri zdravljenju z visokimi odmerki metotreksata. Ti so namreč lahko smrtni, razen ob dodatku folinske kisline, ki spodbuja izplavljanje metotreksata. Po drugi strani pa moramo vedeti, da vitaminski pripravki, ki vsebujejo folno ali folinsko kislino ali njihove derivate, lahko zmanjšajo učinkovitost metotreksata. O aditivnih interakcijah govorimo, ko se učinki dveh zdravil kažejo kot njun seštevek. Največkrat govorimo o seštevku neželenih učinkov, npr. ob sočasni uporabi dveh nefrotoksičnih ali kardiotoksičnih zdravil.

PREVERJANJE INTERAKCIJ MED ZDRAVILI

Interakcije med zdravili navadno preverimo v povzetku glavnih značilnosti zdravila ali v računalniških podatkovnih zbirkah. Nekatere podatkovne zbirke so prosto dostopne (Drugs.com, WebMD Drug Interaction Checker, University of Liverpool Drug Interactions), druge pa plačljive (Lexi-comp Drug Interactions, IBM Micromedex Drug Interactions, Stockley's Interactions Checker). Zavedati se moramo, da imajo tako povzetki glavnih značilnosti zdravila kot podatkovne zbirke svoje omejitve. Pomembne so zlasti omejitve podatkovnih zbirk oz. programov, ki napovedujejo in-

terakcijo, kot npr. različna pomembnost vstopnih podatkov, podatki so večinoma osnovani glede na farmakokinetične parametre, ne upoštevajo se odmerki zdravil, ne razlikujejo med različnimi načini aplikacije zdravil itn. Zaradi navedenega je potrebno veliko pazljivosti in kritične presoje pri interpretaciji in ukrepanju ob interakcijah med zdravili.

ZAKLJUČEK

Pri obravnavi bolnika nas zanimajo predvsem klinično pomembne interakcije, kar pomeni da je potrebna prilagoditev režima odmerjanja ali druga oblika intervencije. Najpogo-

stejše nezaželene so farmakokinetične interakcije na ravni presnove, pogoste so tudi tiste na ravni absorpcije. Farmakodinamične interakcije so pogoste in dostikrat zaželene.

LITERATURA

1. Walker R, Whittlesea C. Clinical Pharmacy and Therapeutics (5. izdaja). Edinburg: Churchill Livingstone, 2012.
2. DiPiro, JT. Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach (7. izdaja). New York: McGraw-Hill Medical, 2008.
3. Alldredge BK, Koda-Kimble MA, Young LY. Applied therapeutics: the clinical use of drugs (8. izdaja). Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
4. Povzetek glavnih značilnosti zdravila, Evropska agencija za zdravila, 2019. Dostopno na svetovnem spletu: [<http://www.ema.europa.eu/>]
5. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Pharmacol Ther. 2013 Apr;138(1):103-41.
6. Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers. Ameriška agencija za zdravila, 2019. Dostopno na svetovnem spletu: [<https://www.fda.gov/home>]

04

Bolniku
prilagojena
laboratorijska
medicina

Tekoča biopsija v bolniku prilagojeni laboratorijski medicini

Darko Černe

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

Zunajcelične nukleinske kisline so vse vrste nukleinskih kislin (DNA, mRNA, miRNA, mtDNA itd.), ki se nahajajo v plazmi, serumu, pa tudi drugih bioloških vzorcih (urin, likvor, bronhialni izpirek itd.) zunaj celic. Odkrila sta jih Mandel in Métais leta 1947. Dolgo neopaženo odkritje je ponovo pritegnilo pozornost v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja zaradi odkritja zvišanih koncentracij DNA v plazmi bolnikov s sistemskim eritematoznim lupusom in kasneje v serumih rakavih bolnikov, še posebej tistih z napredovano obliko bolezni. Proučevanje zunajceličnih nukleinskih kislin se je znova razmahnilo v devetdesetih letih z razvojem novih analitskih metod za kvalitativno analizo DNA in kasneje metod za analizo mRNA oz. miRNA, ter še bolj na prelomu tisočletja z razvojem analitskih metod sekvenciranja.

Zunajcelične nukleinske kisline imajo lastnosti celičnih nukleinskih kislin, le da so fragmentirane. Tako na primer je zunajcelična DNA dvoverižna, nizkomolekularna skupina molekul velikosti od 0,5 do 21 kb, strukturno povezanih s histoni v mono- in oligonukleosomi. Zunajcelične nukleinske kisline se v plazmi lahko nahajajo v obliki apoptotičnih teles, mono- in oligo-nukleosomov, proste in vezane na plazemske proteine. Koncentracije zunajceličnih nukleinskih kislin v telesnih tekočinah so rezultat ravnotežja mehanizmov sproščanja iz celic (fiziološka ali patološka apoptoza, liza, nekroza ali še ne dovolj pojasnjen mehanizem aktivnega izločanja) in mehanizmov odstranjevanja (razgradnja z endonukleazami, odstranjevanje s celicami retikuloendo-

telnega sistema in makrofagi). Mehanizmi odstranjevanja so zelo učinkoviti (razpolovna doba eksogenih nukleosomov v krvi je le nekaj minut), vendar pa vezava zunajceličnih nukleinskih kislin na proteine proces močno upočasni. V plazmi zdravih ljudi sta ravni koncentracije DNA do 50 µg/L in RNA do 250 µg/L, pri bolnikih pa lahko v obeh primerih presežeta 3000 µg/L.

Analiza zunajceličnih nukleinskih kislin omogoča neinvaziven vpogled v dogajanje v tkivu oziroma organu, iz katerega kisline izhajajo. Njihova analiza predstavlja alternativo oziroma dopolnilo k analitiki proteinov. Danas intenzivno proučujejo uporabo kvalitativne in kvantitativne analize zunajceličnih nukleinskih kislin predvsem v prenatalni in tumorski diagnostiki. Najnovejše strokovne objave pa nakazujejo neizmerne potencialne možnosti nadaljne uporabe.

Bolniku prilagojena laboratorijska medicina je način, pri katerem se diagnostična in terapevtska obravnava pacienta prilagajata pacientovim posebnostim z namenom, da se poveča učinkovitost obravnave in zdravljenja. Cilj bolniku prilagojene laboratorijske medicine je na osnovi laboratorijskih preiskav izbrati pravo zdravljenje za pravega pacienta ob pravem času oziroma pravi čas ugotovili nagnjenost k bolezni in uvesti prave preventivne ukrepe. Preglednica v nadaljevanju prikazuje primere klinične prakse, pri katerih analiza zunajceličnih nukleinskih kislin omogoča uresničevanje poslanstva bolniku prilagojene medicine.

LITERATURA

1. Černe D. Sodobna uporaba analize zunajceličnih nukleinskih kislin v laboratorijski medicini. *Farm Vestn* 2010; 61:144-148.
2. Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY et al. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004; 23:879-883.
3. Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. *CR Acad Sci Paris* 1948; 142:241-243.
4. Humar M, Šmid-Korbar J, Obreza A. Farmacevtski terminološki slovar. Druga, dopolnjena in pregledana izdaja. Ljubljana: Založba ZRC, 2019.
5. **Preglednica.** Primeri analize zunajceličnih nukleinskih kislin v bolniku prilagojeni laboratorijski medicini.

Področje uporabe	Primeri uporabe	Prispevek k bolniku prilagojeni medicini
Zgodnja neinvazivna prenatalna diagnostika vrojenih bolezni in gensko svetovanje	Izključitev dedovanja na kromosom X vezanih bolezni (hemofilija, mišična distrofija Duchenne, adrenoleukodistrofija)	Zmanjšana potreba po invazivni diagnostiki
	Kongenitalna adrenalna hiperplazija	Optimizacija zdravljenja
	Izključitev dedovanja avtosomnih dominantnih monogenske bolezni (Huntingtonova bolezen, ahondroplazija, miotonična distrofija)	Zmanjšana potreba po invazivni diagnostiki
	Izključitev aneuploidij (Downov sindrom, trisomija 18, trisomija 13)	Zmanjšana potreba po invazivni diagnostiki
Neinvazivna diagnostika bolezni in zapletov v nosečnosti	Določanje RhD statusa ploda (preprečevanje hemolitične bolezni ploda)	Zmanjšana nepotrebna imunoprofilaksa za 40 %
Diagnostika rakavih bolezni	Neinvazivna identifikacija terapevtskih tarč za biološka zdravila in predikcija zdravljenja	Optimizacija zdravljenja
Spremljanje zdravljenja rakavih bolnikov	Zgodnja zaznava ponovitev bolezni	Zgodnje zdravljenje bolezni
	Zaznava pojava odpornosti na biološka zdravila kot posledica klonske evolucije in selekcije tumorskega genoma	Optimizacija zdravljenja
	Zaznava tumorske heterogenosti (analiza celotnega genoma tumorja, še posebej pri napredovani bolezni)	Optimizacija zdravljenja

Bolniki z osteoporozo in mikrohranila

Janja Marc

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

OSTEOPOROZA – BOLEZEN KRHKIH KOSTI

Osteoporozo je bolezen krhkih kosti, ki je posledica močno zmanjšane količine kostne mase zaradi genetskih dejavnikov in dejavnikov okolja. Prizadene vsako tretjo žensko in vsakega dvanajstega moškega po petdesetem letu starosti. V Evropi beležimo 1,5 milijona osteoporoznih zlomov letno, od tega 300.000 zlomov kolka, 700.000 zlomov vretenca, 250.000 zlomov zapestja.

Pri preventivi osteoporoze je treba biti usmerjen v tri področja: 1. primerno prehrano za zdrave kosti, 2. ustrezno fizično aktivnost in 3. preprečevanju padcev. Za zdrave kosti je treba v prehrano vključiti dovolj kalcija in vitamina D in seveda mikrohranila, ki jih kostne celice potrebujejo za svoje delovanje. Fizična aktivnost močno vzpodbuja oste-

oblaste in povečuje MKG. Najprimernejše so vadbе z utežmi, hoja, tek, ples, medtem ko plavanje ali kolesarjenje nista tako učinkovita. Že vpliv gravitacije na kakovost kostnega tkiva lepo ponazarjajo astronauti. Pri teh so zabeležili 1,8-odstotni upad MKG za vsak mesec, ki so ga preživeli v vesolju. Podobno so tudi vrednosti MKG pri debelih ljudeh mnogo višje od ljudi z normalno ali zmanjšano telesno težo.

Cilj vseh preventivnih ukrepov pri osteoporozi je doseči čim večje zaloge med 25. in 35. letom ter čim bolj upočasniti izgubljanje kostne mase po 35. letu starosti. Oboje zahteva ustrezno preskrbo s hranili, in če je mogoče v kombinaciji z dovolj veliko fizično aktivnostjo.

MIKROHRANILA ZA ZDRAVE KOSTI IN PREPREČEVANJE ZLOMOV

Sinteza in mineralizacija kolagena ter remodeliranje kostne mase so odvisne od aktivnosti kostnih celic. Te potre-

bujemo za optimalno delovanje ustrezno preskrbo s hranili, kot so kalcij, fosfor, magnezij, cink ter vitamini D, K in C.

KALCIJ

Kalcij je najbolj razširjen mineral v telesu in več kot 99 % ga je shranjenega v kosteh. Raven kalcija v krvi je natančno uravnana. Ob pomanjkanju se poveča kostna resorpcija in izplavljanje kalcija iz kosti v kri, dokler se njegova raven ne uravna. Te procese nadzorujejo kalciotropni hormoni: PTH, vitamin D in kalcitonin. Trdnost in struktura kostnine sta torej precej odvisni od vnosa kalcija. Priporočeni vnosi kalcija so v puberteti in pri mladostnikih najviš-

ji in znašajo 1200 mg/dan, pri odraslih in starostniki pa se zmanjšajo na 1000 mg/dan za oba spola. Za sedaj ni dokazov, da bi povečan vnos kalcija nad 1000 mg/dan izboljšal kostnino pri pomenopavznih ženskah. Absorpcija kalcija v črevesju je lahko manjša, če so v hrani prisotni oksalati, nekatere vlaknine in malo maščob. Biološko razpoložljivost kalcija v telesu zvišajo vitamin D in estrogeni. Vnos kalcija nad 2500 mg/dan ni priporočljiv.

VITAMIN D

Vitamin D je skupina dveh sekosteroidov in njunih presnovkov, ergokalciferola oz. vitamina D₂ in holekalciferola oz. vitamina D₃. Neobičajno je, da enega od teh vitaminov, vitamin D₃, lahko sintetiziramo sami in zato nismo odvisni samo od vnosa s hrano. Skupaj s PTH in kalcitoninom ga uvrščamo med kalciotropne hormone, ki uravnavajo ravni kalcija in fosfatov v krvi. Preskrbo telesa z vitaminom D ocenjujemo preko ravni 25-OH vitamina D v krvi, ki

mora znašati 30–35 nmol/L. Evropska agencija za varno hrano, EFSA, priporoča vnos vitamina D 15 µg/dan (600 I.U.) v celotni populaciji, starejši od enega leta. Študije namreč kažejo, da je treba preprečevati zgolj pomanjkanje vitamina D, ker to lahko oslabi kostno tkivo, povečani vnosi pa nimajo dodatnega pozitivnega učinka, čeprav se uživa skupaj s kalcijem. Inštitut za varovanje zdravja v Sloveniji priporoča vnos 20 µg/dan.

FOSFOR

Fosfor (P) je drugi najbolj razširjen element v človeškem telesu in sodeluje v številnih biokemijskih procesih, kot npr. vzdrževanje celične energije, kislinsko-bazičnega ravnovesja, strukture celičnih membrane. Nahaja se v zobeh (14 %) in kosteh (85 %), kjer je v obliki kalcijevega hidroksiapatita. Homeostaza fosforja je večinoma pasivna in sledi kalciju. Pri zdravih odraslih ljudeh znaša molarno razmerje med

kalcijem in fosforjem od 1,6–1,8. V nasprotju s kalcijem je pomanjkanje fosforja redko, saj je prisoten v številnih živilih (meso, ribe, mlečni izdelki), torej v hrani, ki vsebuje veliko proteinov. Priporočen vnos fosforja pri odraslih znaša 700 mg/dan in je precej manjši od vnosa, ki se priporoča pri otrocih in mladostnikih (1250 mg/dan).

MAGNEZIJ

Približno 60 % magnezija v človeškem telesu je shranjeno v kosteh, okoli 25 % pa v mišicah. Vpliv magnezija na izboljšanje kostnine pri osteoporozi ni dokazan, čeprav je pomemben tako za normalno mineralizacijo kot tudi za delovanje kostnih celic. Magnezijevi ioni lahko nadomestijo

kalcijeve v hidroksiapatitu. Pri tem se kristali zmanjšajo in kostno tkivo se (do neke mere) ojača. Za normalno delovanje kostnih celic in mineralizacijo znaša priporočen vnos za ženske 300–310 mg/dan, za moške pa 350–400 mg/dan.

VITAMIN C

Vitamin C je v kostni biologiji pomemben za kakovost in trdnost kolagenskega matriksa. Deluje kot koencim lizil-hidroksilaze in prolil-hidroksilaze, ki omogočata hidroksilacijo lizina in prolina. Ta je potrebna zato, da lahko med kolagenskimi vlakni nastanejo prečni povezovalci. Ti ojačajo kostni kolagen in zagotavljajo njegovo trdnost. Vitamin C deluje poleg tega tudi neposredno na kostne celice

in v splošnem izkazuje pozitivne učinke na MKG. Priporočen vnos vitamina C pri odraslih znaša 100 mg/dan. Vnašamo ga s sadjem in nekaterimi vrstami zelenjave.

VITAMIN K

Vitamin K predstavlja skupina maščobotopnih kinonov: K1 (filokinon), K2 (menakinon), in K3 (menadion). V telesu delujejo kot koencimi—karboksilaze ter omogočajo—karboksilacijo glutamilnih aminokislinskih ostankov v t.i. od vitamina K odvisnih proteinih. Ti koordinativno vežejo kalcijeve ione in jih najdemo med dejavniki strjevanja krvi, prenašalnimi proteini za absorpcijo ali reabsorpcijo kalcijevih ionov ter mineralizacijo kostnine. Pomanjkanje vita-

mina K lahko vodi v slabšo mineralizacijo kostnega tkiva. Po drugi strani pa lahko vitamin K2 tudi neposredno anabolično deluje na kostne celice. Kljub opisanemu učinku pa klinične raziskave ne potrjujejo povezanosti večjega vnosa vitamina K z večjo mineralno kostno gostoto (MKG) ali z zmanjšanjem verjetnosti za zlom. Priporočeni vnos znaša za ženske 60–65 µg/dan, za moške pa 70–80 µg/dan.

CINK

Cink je takoj za železom najbolj razširjen esencialni element v sledovih v telesu. Kot koencim se nahaja v številnih encimih, tudi v kostnih celicah, npr. v alkalni fosfatazi, karbonat-dehidratazi, timidin-kinazi, karboksi-peptidazi. Pomemben je tudi v drugih proteinih, ki niso encimi, npr. transkripcijski dejavniki s strukturo cinkovih prstov, kot sta estrogenski receptor in vitamin D receptor. V kosteh omogoča normalno aktivnost osteoblastov in sintezo kolagena. Kot koencim alkalne fosfataze je vpleten tudi v minerali-

zacijo kostnega matriksa. Priporoča se sočasno uživanje cinka, kalcija in magnezija, ker so učinki na kosti močnejši. Priporočeni vnos cinka za starejše znaša 7,0 mg/dan za ženske in 10,0 mg/dan za moške. Pomemben prehranski vir cinka predstavljajo perutnina, meso, jajca in nekatere školjke. Čeprav je prisoten tudi v žitaricah, je njegova biološka uporabnost majhna zaradi vezave s fitati. Starostniki pogosto vnašajo premalo cinka s hrano.

OSTALA MIKROHRANILA

Poleg naštetih pa v kostni biologiji sodelujejo še številna druga mikrohranila, kot so železo, natrij, bor, selen, baker, folati in vitamin A.

ZAKLJUČEK

Šele primeren vnos makro- in mikrohranil omogoča normalno delovanje kostnih celic in zadostno mineralizacijo kolagena. Klinične študije dokazujejo, da se dolgotrajno pomanjkanje teh hranil odraža z zmanjšanjem MKG in osteoporoze. Vendar osteoporoze ne moremo pozdraviti samo z vnosom hranil, lahko le preprečimo poslabšanje bolezni. V nekaterih primerih lahko vitamini in mikrohranila

ojačajo učinke zdravljenja osteoporoze, npr. pri terapiji z zolendronatom. Za zdrave kosti je treba ob vnosu mikrohranil vzdrževati tudi fizično aktivnost in se izogibati določenim razvadam.

LITERATURA

1. Mazi L. Epidemiology of osteoporosis. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2008; 5(1): 11–13.
2. LeBlanc A, Schneider V, Shackelford L, West S, Oganov V, Bakulin A, et al. Bone mineral and lean tissue loss after long duration space flight. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2000; 1: 157–160.
3. Referenčne vrednosti za vnos vitaminov in mineralov – tabelarična priporočila za otroke, mladostnike, odrasle in starejše, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, 2013.
4. EFSA. Scientific Opinions on dietary reference values for Calcium. 2015, <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4101.htm>
5. Heneghan C, Mahtani KR. Vitamin D does not prevent fractures and falls. *BMJ Evid Based Med.* 2019 pii: bmjebm-2018-111129. doi: 10.1136/bmjebm-2018-111129.
6. EFSA. Dietary Reference Values for phosphorus. 2015, <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4185.htm>.
7. Orchard TS, Larson LC, Alghothani N, Bout-Tabaku S, Cauley JA, Chen Z, et al.. Magnesium intake, bone mineral density, and fractures: results from the Women's Health Initiative Observational Study. *Am J Clin Nutr.* 2014; 99(4): 926–933.
8. Deyhim F, Strong K, Deyhim N, Vandyousefi S, Stamatikos A, Faraji B. Vitamin C reverses bone loss in an osteopenic rat model of osteoporosis. *Int J Vitam Nutr Res.* 2019; doi: 10.1024/0300-9831/a000486. [Epub ahead of print].
9. Szulc, P., Chapuy, M.C., Meunier, P.J., and Delmas, P.D. Serum under-carboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture: A three year follow-up study. *Bone.* 1996; 18:487–488.
10. Myneni VD, Mezey E. Regulation of bone remodeling by vitamin K2. *Oral dis.* 2017; 23(8):1021–8. 10.1111/odi.12624.
11. Turck D, Bresson JL, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, Heironen M, et al. EFSA Dietary reference values for vitamin K. *EFSA J.* 2017;15(5):4780
12. Levaot N, Hershfinkel M. How cellular Zn₂₊ signaling drives physiological functions. *Cell Calcium.* 2018; 75:53-63.
13. Zhao B, Zhao W, Wang Y, Zhao Z, Zhao C, Wang S, et al. Prior administration of vitamin K2 improves the therapeutic effects of zoledronic acid in ovariectomized rats by antagonizing zoledronic acid-induced inhibition of osteoblasts proliferation and mineralization. *PLoS One.* 2018;13(8):e0202269. doi:10.1371/journal.pone.0202269. eCollection 2018.
14. Dasarathy J, Labrador H. Bone Health in Women. *Prim Care.* 2018; 45(4):643-657.

Zakaj imajo moški trdnejše kosti – vpliv izražanja RANKL

Nika Lovšin

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

Osteoporoza je presnovna bolezen skeleta, ki se kaže v majhni kostni gostoti in spremembi mikroarhitekture kostnega tkiva, kar povečuje tveganje za zlome. Najpogosteje se pojavlja pri ženskah v pomenopavznem obdobju, vendar pa lahko prizadene tudi moške. Po 50. letu starosti bosta do konca življenja utrpela zlom vsaka tretja ženska in vsak peti moški. Klinična pomembnost osteoporoze se zaradi krhkih in lomljivih kosti kaže v povečani verjetnosti za pojav zlomov že ob blagih padcih s stojne višine. Pri osteoporozi pride do porušenega uravnavanja kostne remodelacije, ravnotežja med kostno izgradnjo in kostno razgradnjo. Pri kostni izgradnji sodelujejo osteoblasti, pri kostni razgradnji pa osteoklasti. Uravnavanje interakcij med osteoklasti in osteoblasti je odgovorno za zagotavljanje homeostaze med kostno izgradnjo in razgradnjo. V uravnavanje kostne remodelacije so vpleteni hormoni, kot so spolni, rastni in ščitnični, vitamin D in kortikosteroidi ter lokalni regulatorji, med katere spadajo številni citokini ter rastni in diferenciacijski dejavniki, kot sta osteoprotegerin (OPG) in ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (RANKL).

Za uravnavanje kostne resorpcije je odločilna signalna pot RANK/RANKL/OPG (2, 4). Osteociti spodbudijo osteoblaste k izločanju regulatornega faktorja RANKL, ki se veže na receptor RANK na osteoklastih. Interakcija med RANKL/RANK aktivira osteoklastogenezo (2). Osteoklasti pa so odgovorni za razgradnjo kosti. Osteoblasti in osteociti izločajo tudi zaviralca kostne razgradnje – molekulo OPG, ki se veže na RANKL in prepreči vezavo liganda RANKL na receptor RANK ter prepreči aktivacijo osteoklastogeneze.

Ligand RANKL je protein, sestavljen iz treh domen: citoplazemske, transmembranske in zunajcelične domene, na kateri je vezavno mesto za receptor RANK. Zapis za protein RANKL nosi gen TNFSF11, ki se izraža v kostnem mozgu, osteoblastih, osteocitih, limfocitih B in T pa tudi v pljučih, srcu, skeletnih mišicah, mlečnih žlezah in placenti. Protein RANKL se v človeškem telesu nahaja tako v topni kot transmembranski obliki. Poleg kostne remodu-

lacije je ligand RANKL vključen v organogenezo limfnih vozlov, razvoj imunskih celic, v celični imunski odziv pri kroničnem vnetju, razvoj mlečnih žlez in celic Paneth M v prebavilih ter termoregulaciji. Ker je porušeno uravnavanje RANKL vpleteno v razvoj osteoporoze, se v klinični praksi za zdravljenje osteoporoze uporablja monoklonsko protitelo proti RANKL, denosumab. Vpletenost proteina RANKL v širjenje metastaz pri raku je narekovalo uporabo denosumaba tudi za preprečevanje kostnih zapletov pri bolnikih z metastazami.

Na povečano razgradnjo kosti preko neposrednega učinka na osteoklaste ali preko sistema RANKL/RANK/OPG delujejo paratiroidni hormon, vitamin D, kortikosteroidi, prostaglandin E2 in vnetni citokini (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-17, TNF- α). Na drugi strani pa IFN- γ , IFN- β , IL-4, IL-10, IL-13, IL-18 in estrogeni preko RANKL/RANK/OPG sistema zavirajo osteoklastne učinke. Upad estrogenov je eden od glavnih razlogov za razvoj pomenopavzne osteoporoze pri ženskah, na kostno remodelacijo pa vplivajo tudi drugi dejavniki. Ker je RANKL ključna molekula v signalni poti RANKL/RANK/OPG je poznavanje njegovega nastajanja pomembno za razumevanje mehanizmov porušene uravnave kostne razgradnje. Na izražanje gena TNFSF11 in s tem na nastajanje proteina RANKL vplivajo različni regulatorni elementi, ki se nahajajo v promotorski regiji gena TNFSF11, tudi do več sto baznih parov pred mestom začetka transkripcije. Na te promotorske regije se vežejo številni regulatorni proteini, imenovani transkripcijski dejavniki, ki se s posebnimi strukturnimi elementi vežejo na specifična zaporedja na kromosomu in vplivajo na izražanje gena. Aktivacija izražanja gena za RANKL s paratiroidnim hormonom (PTH) poteka preko aktivacije proteinske kinaze A (PKA) in transkripcijskega faktorja CREB (cAMP response element binding protein). Transkripcijski faktor CREB je pomemben tudi pri stimulaciji izražanja RANKL z vitaminom D₃ in citokinom gp130. Omenjeni transkripcijski faktorji se vežeje na regulatorne regije, ki se nahajajo več kot 70 kb pred mestom za začetek transkripcije. Odkriti so

bili tudi transkripcijski faktorji (E2F in CEPB), ki vplivajo na izražanje RANKL prek vezave na proksimalno zaporedje promotorja, ki se nahaja nekaj 100 bp pred mestom za začetek transkripcije.

V okviru raziskav na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod vodstvom prof. Janje Marc potekajo raziskave uravnavanja izražanja genov pri bolnikih z osteoporozo. V raziskavi so Dragojevič in sod. pokazali, da so osteoklastogeni citokini RANKL, makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (M-CSF), sklerostin (SOST) in Dickkopf-1 (DKK-1) bolj izraženi v kostnem tkivu bolnikov z OP v primerjavi z OA. Medtem ko je bilo izražanje osteoklastogenih citokinov IL-1 in IL-6 povišano, je bilo izražanje antiosteoklastogenega citokina IFN- γ v kostnem tkivu bolnikov z nizkoenergijskim zlomom kolka znižano v primerjavi s kostnim tkivom bolnikov z OA. Pri osteoporoznih bolnikih so dokazali povišano izražanje genov za RANK in RANKL, medtem ko je bilo izražanje gena za OPG v OA tkivu neznačilno povišano. Kostno tkivo, uporabljeno v študiji izražanja genov, je bilo tudi podrobno fenotipizirano z analizo mikroarhitekture kosti pri obeh skupinah bolnikov.

Poleg genov, za katere je že znano spremenjeno izražanje med OP in OA pacienti, smo v najnovejši študiji raziskali tudi izražanje gena SRY, ki se izraža le pri moških. Presemetljivo smo ugotovili, da je izražanje SRY pri moških z

osteoporozo izrazito znižano v primerjavi z moškimi, ki nimajo osteoporoze. Hkrati je pri teh pacientih izrazito povišano izražanje RANKL. Ker je pri moških z osteoporozo znižano izražanje gena SRY povezano s povišanim izražanjem gena za RANKL predvidevamo, da je SRY eden izmed regulatorjev izražanja RANKL in utegne biti odgovoren za razliko v izražanju RANKL med ženskami in moškimi. Nedvomno pa izsledki naših raziskav na humnem kostnem tkivu in celičnih modelih nakazujejo, da se regulacija RANKL med spoloma razlikuje na ravni uravnavanja izražanja genov in je povezana s pojavnostjo osteoporoze tako pri ženskah kot pri moških.

Poleg hormonov na razlike v kostni gostoti med ženskami in moškimi vplivajo številni genetski in negenetski dejavniki. Razlike v kostni gostoti med spoloma so na eni strani lahko posledica izražanja različnih od spola odvisnih genov, na drugi strani pa lahko različni okoljski dejavniki pri moških in ženskah vplivajo na spremenjeno izražanje istih genov. V raziskavi uravnavanja izražanja liganda RANKL smo odkrili gen, ki se izraža le pri moških, in nosi zapis za transkripcijski faktor SRY. Predvidevamo, da je SRY odgovoren za znižano izražanje RANKL pri moških in jih ščiti pred zmanjšanjem kostne gostote. Boljše poznavanje od spola odvisnih dejavnikov, ki vplivajo na kostno preno, bo nedvomno prispevalo k razvoju pacientom prilagojenih metod za preprečevanje izgube kostne gostote.

LITERATURA

- Harvey, N, McCloskey, E. Gaps and solutions in bone health: A global framework for improvement 2016. Dosegljivo na strani (25.9.2017): <http://share.iofbonehealth.org/WOD/2016/thematic-report/WOD16-report-WEB-EN.pdf>
- Mencej Bedrač S, Ostanek B, Mlakar V, Zupan J, Kocjan T, Preželj J, et al.
- Sodobni pogled na nastanek osteoporoze. Farm. vestnik 2012; 63: 269–78.
- Dostopno na strani (25.9.2017): <http://ns.umich.edu/Releases/2005/Feb05/bone.html>
- Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. Arch Biochem Biophys. 2008; 473: 139–46.
- Liu C, Walter TS, Huang P, Zhang S, Zhu X, Wu Y, et al. Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling. J Immunol. 2010; 184: 6910–9.
- O'Brien CA. Control of RANKL gene expression. Bone 2010; 46: 911–9.
- Ghayor C, Weber FE. Epigenetic Regulation of Bone Remodeling and Its Impacts in Osteoporosis. Int J Mol Sci. 2016; 17.
- Cawthon PM. Gender differences in osteoporosis and fractures. Clin Orthop Relat Res. 2011; 469: 1900–5.
- Karasik D, Ferrari SL. Contribution of gender-specific genetic factors to osteoporosis risk. Ann Hum Genet. 2008; 72: 696–714.
- Dragojevič J, Zupan J, Haring G, Herman S, Komadina R, Marc J. Triglyceride metabolism in bone tissue is associated with osteoblast and osteoclast differentiation: a gene expression study. J Bone Miner Metab. 2013; 31: 512–9.
- Mencej S, Albagha OM, Preželj J, Kocjan T, Marc J. Tumour necrosis factor superfamily member 11 gene promoter polymorphisms modulate promoter activity and influence bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. J Mol Endocrinol. 2008; 40: 273–9.
- Zupan J, Komadina R, Marc J. The relationship between osteoclastogenic and anti-osteoclastogenic pro-inflammatory cytokines differs in human osteoporotic and osteoarthritic bone tissues. J Biomed Sci. 2012; 19: 28.
- Zupan J, van't Hof RJ, Vindisar F, Haring G, Trebse R, Komadina R, et al. Osteoarthritic versus osteoporotic bone and intra-skeletal variations in normal bone: evaluation with microCT and bone histomorphometry. J Orthop Res. 2013; 31: 1059–66.
- Kodric K, Zupan J, Kranjc T, et al. Sex-determining region Y (SRY) attributes to gender differences in RANKL expression and incidence of osteoporosis. Exp Mol Med 2019; 51(8): 97.

Farmakogenetika v izobraževanju po svetu

Nataša Karas Kuželički, Irena Prodan Žitnik

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

UVOD

Farmakogenetika je veda, ki preučuje povezavo med genetskim ustrojem posameznika in njegovim odzivom na zdravila, ter je zato ključnega pomena pri implementaciji t. i. personalizirane medicine. Od zaključka projekta Humani genom leta 2003 se število farmakogenetskih označevalcev vztrajno povečuje, zdravstveni delavci pa so soočeni z izzivom implementacije le-teh v klinično prakso. Presemetljivo je kljub začetnemu navdušenju nad farmakogenetiko uvajanje farmakogenetskih označevalcev v načrtovanje zdravljenja razmeroma počasno. Kot eden izmed glavnih razlogov za počasno uvajanje farmakogenetike v klinično prakso je bilo identificirano pomanjkanje znanj s področja farmakogenetike s strani zdravstvenih delavcev. Številne študije so pokazale, da se večina zdravstvenih delavcev zelo strinja z uporabo farmakogenetskih podatkov v klinični praksi, vendar le-teh ne uporabljajo, ker se zavedajo lastnega pomanjkanja znanja na tem področju. Iz tega sledi, da je uvajanje vsebin farmakogenetike v študijske programe zdravstvenih smeri ter postavitve minimalnih standardov na tem področju ključnega pomena za uspešnost in hitrost implementacije farmakogenetike v klinično prakso.

Prvi poskus postavitve smernic in priporočil na področju farmakogenetskega izobraževanja v visokem šolstvu je predstavljal članek Gurwitz et al. iz leta 2005. Avtorji članka so predlagali minimalne standarde na področju farmakogenetskega izobraževanja na študijskih programih medicine, farmacije in drugih zdravstvenih poklicev, med drugim vsaj 4 (optimalno pa 8) ure predavanj na temo farmakogenetike na študijski program. Od izida omenjenega članka ni bila opravljena nobena raziskava, ki bi ocenila trenutno stanje na področju poučevanja farmakogenetike v visokem šolstvu, prav tako pa niso bila izdana nadaljnja priporočila. Zato smo se v predstavljeni raziskavi lotili ocene stanja na tem področju, in sicer na globalni ravni, kot referenco pa smo uporabili članek Gurwitz et al.. Cilj študije je bil ugotoviti trenutni status farmakogenetskega izobraževanja v študijskih programih medicine, farmacije in drugih zdravstvenih poklicev na osnovi priporočil iz leta 2005, ter ugotoviti, ali je od takrat opazen napredek na tem področju. Na osnovi rezultatov raziskave smo predlagali nadaljnja priporočila in smernice.

METODE

Načrt študije

V študijo smo vključili 248 fakultet, ki izobražujejo za različne poklice v zdravstvu (medicina, farmacija, zdravstvena nega in drugi poklici v zdravstvu) iz Evrope, Azije, Afrike, Severne in Južne Amerike, ter Avstralije in Oceanije. Na izbrane fakultete smo po elektronski pošti poslali prošnjo za sodelovanje ter povezavo do spletne ankete.

Izbor fakultet

Sodelujoče fakultete smo izbrali na spletni strani Quacquarelli Symonds (QS) World University Rankings (<http://www.topuniversities.com/>), ter Webometrics Ranking of World Universities (<http://www.webometrics.info/en>) po protokolu, ki je bolj podrobno opisan drugje. Da bi se izognili biasu prestižnih univerz, smo izbrali fakultete tudi med članica-

mi Evropskega združenja za farmakogenetiko in personalizirano terapijo ((European Society of Pharmacogenomics and Personalised Therapy (ESPT)).

Spletna anketa

Vprašalnik je predstavljal razširjeno verzijo vprašalnika, uporabljenega v študiji Gurwitz et al. iz leta 2005. Odgovore smo zbirali med 8. septembrom 2016 in 21. februarjem 2017 z uporabo platforme za spletno anketiranje Ika (<http://english.ika.si/>).

Statistična analiza

Za primerjavo dveh skupin smo uporabili Fisherjev natančni test za kategorične podatke in Mann-Whitney U test za nenormalno porazdeljene kontinuirane podatke. Za primerjave med tremi ali več skupinami smo uporabili Fisherjev natančni test za kategorične podatke in Kruskal-Wallis test za nenormalno porazdeljene kontinuirane podatke. Za testiranje korelacije smo uporabili neparametrični Spearmannov test. Vsi statistični testi so bili izvedeni s pomočjo statističnega programa SPSS (verzija 24; IBM, Armonk, New York, USA). Kot mejo statistične značilnosti smo upoštevali $\alpha = 0,05$.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Od 248 povabljenih fakultet jih v sodelovanje privolilo 69 (27,8 %), s tem da smo opazili znatne razlike glede na regijo; v Evropi je privolilo v sodelovanje 34,7 % fakultet, v Južni Ameriki pa le 9 %.

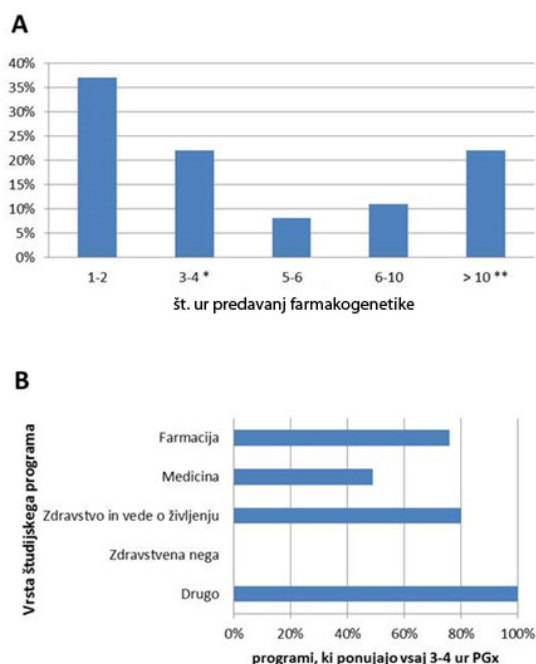
Vključenost farmakogenetike v visokošolske študijske programe zdravstvenih smeri

Kar 86,6 % preiskovanih študijskih programov ima v svoj predmetnik vključene teme s področja farmakogenetike. V 50 % primerov farmakogenetiko poučujejo v sklopu farmakologije, v 20 % študijskih programov je farmakogenetika samostojen izbirni, v 10 % pa obvezni predmet. Preostali študijski programi poučujejo farmakogenetiko v sklopu drugih predmetov, med katerimi izstopata humana genetika in klinična biokemija. Omenjeni rezultati so v skladu s študijo Murphy et al., ki je poročala, da ima 89 % fakultet za farmacijo v ZDA v svoje programe vključeno farmakogenetiko, od tega 21 % kot samostojen predmet.

Število ur predavanj, posvečenih farmakogenetiki

Večina programov ponuja 1–2 uri predavanj farmakogenetike, približno enak delež programov pa ponuja 3–4 ure in >10 ur predavanj (Slika 1A). Zahtevani minimum ur (3–4 ure) ponuja 63 % programov, s tem da minimalno priporočeno število ur (3–4 ure) s področja farmakogenetike ponuja večji delež fakultet za farmacijo, zdravstvo in vede o življenju kot medicinskih fakultet (Fisher exact $p = 0,024$) (Slika 1B).

Tudi druge študije so poročale o razmeroma nizki implementaciji farmakogenetike v programe medicine; le 21 % medicinskih fakultet v Veliki Britaniji (9) ter 28 % v ZDA in Kanadi (10) je v svoje programe vključilo 4 ali več ur predavanj iz farmakogenetike.



Slika 1. Število ur predavanj iz farmakogenetike. (A) Število ur predavanj iz farmakogenetike; *, minimalno priporočeno število ur predavanj; **, mediana (minimum-maksimum) števila ur predavanj, 21,5 ur (12–50 ur) na program. (B) Delež programov, ki ponujajo minimalno priporočeno število ur predavanj (3–4 ur) glede na vrsto študijskega programa.

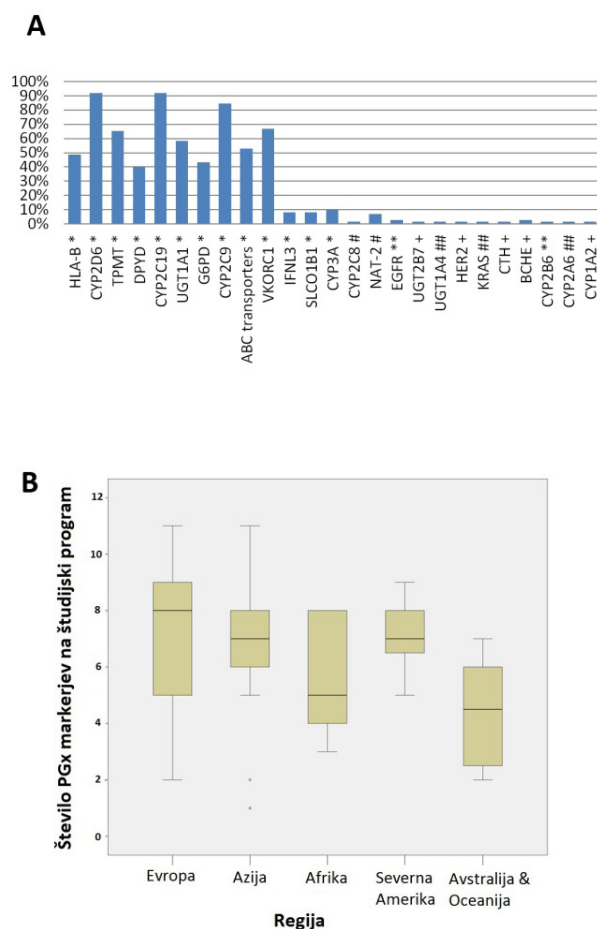
Uporaba farmakogenetskih označevalcev v izobraževalnem procesu

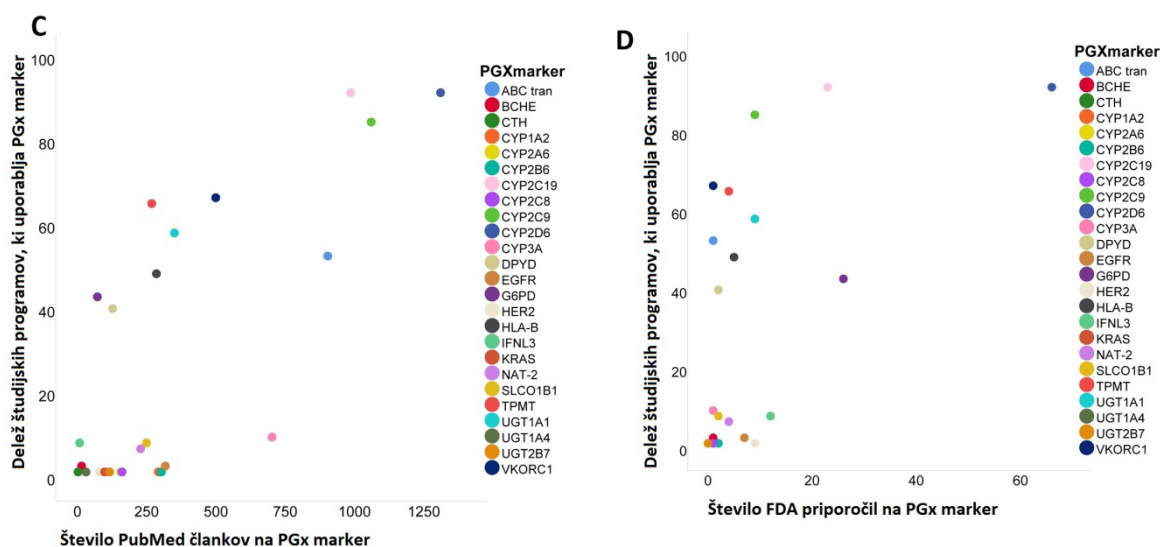
Vrsta in frekvenca uporabe farmakogenetskih označevalcev v izobraževalne namene sta prikazani na Sliki 2A. V povprečju študentje dobijo največ znanja o CYP genih (CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9), ki so vključeni v učne načrte > 80 % preučevanih študijskih programov. Po pogostosti uporabe jim sledijo geni VKORC1, TPMT, UGT1A1, ter ABC transporterji s frekvencami med 50 in 70 % (Slika 2A). Ugotovili smo, da se označevalci, ki jih PharmGKB uvršča med »high level of evidence«, bolj pogosto uporabljajo tudi v izobraževalne namene (Kruskal-Wallis $p = 0,001$) (Slika 2A).

Mediana števila farmakogenetskih označevalcev na študijski program je bila 7 (minimum-maksimum, 1–11). Študijski

programi iz Evrope so vključevali največ označevalcev, sledili so jim študijski programi iz Severne Amerike, Azije, Afrike ter Avstralije/Oceanije (Kruskal-Wallis $p = 0,033$) (Slika 2B). Podatkov za Južno Ameriko nismo vključili v statistično analizo zaradi premajhnega števila sodelujočih fakultet.

Preučili smo tudi korelacijo med frekvenco uporabe posameznega označevalca in številom publikacij v bazi PubMed, ki se nanašajo na ta označevalec (Slika 2C), ter korelacijo s številom priporočil FDA za omenjeni označevalec (Slika 2D). Iz slike 2A je razvidno, da se bolj relevantni označevalci bolj pogosto uporabljajo v izobraževalne namene kot tisti z nižjo stopnjo relevance (Kruskal-Wallis, $p = 0,001$).





Slika 2. Uporaba PGx označevalcev v izobraževalne namene. (A) Delež študijskih programov, ki poučuje o naštetih farmakogenetskih označevalcih. PharmGKB stopnja relevance za posamezne markerje: *, 1A; **, 1B; #, 2A; ##, 2B; +, 3. (B) Število PGx označevalcev na program. (C, D) Korelacija med frekvenco uporabe PGx označevalca v izobraževalne namene in številom člankov v PubMed (C) ter številom priporočil US FDA (D). Statistično značilna korelacija je prisotna za število člankov v PubMed (C; Spearman's rho, 0,643, $p = 0,001$) in število priporočil FDA (D; Spearman's rho, 0,635, $p = 0,001$).

UČNI VIRI V FARMAKOGENETSKEM IZOBRAŽEVANJU

Večina učiteljev farmakogenetike je poročala o uporabi originalnih znanstvenih člankov kot prevladujočega učnega vira (71 %). Na drugem mestu je uporaba internetnih strani (49 %), sledijo učbeniki (42 %). Le 20 % vprašanih učiteljev uporablja druge učne vire, kot so doktorske naloge, simulacije in spletne aplikacije.

Med internetnimi bazami podatkov se je za najbolj priljubljeno izkazala PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org/>), ki

jo uporablja 60 % učiteljev. Sledi stran FDA (<https://www.fda.gov/>) (17 %) in The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) (<http://cpicpgx.org/>) s 14 %.

Večina uporabljenih učbenikov je bila s področja farmakologije, npr. The Pharmacological Basis of Therapeutics (Goodman & Gilman) (27 %) ter Pharmacology (Rang & Dale) (20 %). Najbolj uporabljan specializiran učbenik je bil Pharmacogenomics (Kalow, Meyer & Tyndale) s 13 %.

ZAKLJUČEK

Iz rezultatov raziskave lahko sklepamo, da je bila večina priporočil iz leta 2005 (6) implementirana, ter da je na področju farmakogenetskega izobraževanja prišlo do znatnega izboljšanja. Seveda pa to ne pomeni, da niso potrebne

nadaljnje izboljšave, ki morajo slediti razvoju znanosti in stroke. V Tabeli 1 so podani podatki o implementaciji smernic iz leta 2005 ter nadaljnja priporočila za izboljšave na posameznih področjih.

Tabela 1. Izpolnjevanje priporočil iz leta 2005 in nadaljnja priporočila za izboljšave.

Priporočila iz leta 2005	Izpolnjevanje priporočil na preučevanih inštitucijah	Nadaljnja priporočila
Vključiti poučevanje farmakogenetike v osnovne učne načrte farmakologije na fakultetah za farmacijo, medicino in druge poklice v zdravstvu	Da	Vključiti farmakogenetiko kot samostojen obvezeni ali izbirni predmet na fakultetah za farmacijo in druge poklice v zdravstvu (primarno pri oblikovanju novih študijskih programov ali prenovi obstoječih)
Vključiti farmakogenetiko v osnovno izobraževanje zdravnikov, farmacevtov, medicinskih sester in drugih poklicev v zdravstvu	Da	Ni nadaljnjih priporočil
Vsaj 4 ure predavanj iz farmakogenetike na študijski program	Delno	Implementirati vsaj 4 ure predavanj v študijskih programih medicine in zdravstvene nege
Vključiti klinično relevantne farmakogenetske označevalce v izobraževalni proces	Delno	Povečati uporabo 1A označevalcev, ki ne spadajo v družino genov CYP
Uporaba sodobnih učnih virov	Da	Ni nadaljnjih priporočil
Vključiti posebno poglavje, posvečeno farmakogenetiki, v učbenike farmakologije	Da	Povečati število učbenikov, ki so posvečeni izključno farmakogenetiki
Uporaba preglednih člankov, internetnih virov in študij primerov pri poučevanju farmakogenetike	Da	Ni nadaljnjih priporočil

Nadaljnje študije na področju farmakogenetskega izobraževanja bi morale nasloviti tudi farmakogenetiko kot del vseživljenjskega izobraževanja strokovnjakov v zdravstvu ter izobraževanje laične javnosti na tem področju. Omenjene oblike izobraževanja bodo prav tako ključnega po-

mena za implementacijo farmakogenetskih pristopov v klinično prakso.

LITERATURA

1. Luzum J, Pakyz R, Elsey A, Haidar C, Peterson J, Whirl-Carrillo M, et al. „The Pharmacogenomics Research Network Translational Pharmacogenetics Program: Outcomes and Metrics of Pharmacogenetic Implementations Across Diverse Healthcare Systems“. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2017;102(3):502-10.
2. Sperber NR, Carpenter JS, Cavallari LH, Damschroder LJ, Cooper-DeHoff RM, Denny JC, et al. Challenges and strategies for implementing genomic services in diverse settings: experiences from the Implementing GeNomics In pracTice (IGNITE) network. *BMC Medical Genomics*. 2017;10(1):35.
3. Just K, Steffens M, Swen J, Patrinos G, Guchelaar H, Stingl J. Medical education in pharmacogenomics-results from a survey on pharmacogenetic knowledge in healthcare professionals within the European pharmacogenomics clinical implementation project Ubiquitous Pharmacogenomics (U-PGx). *European journal of clinical pharmacology*. 2017;73(10):1247-52.
4. Malentacchi F, Mancini I, Brandslund I, Vermeersch P, Schwab M, Marc J, et al. Is laboratory medicine ready for the era of personalized medicine? A survey addressed to laboratory directors of hospitals/academic schools of medicine in Europe. *Clin Chem Lab Med*. 2015 Jun;53(7):981-8.
5. Taber KAJ, Dickinson BD. Pharmacogenomic knowledge gaps and educational resource needs among physicians in selected specialties. *Pharmacogenomics and personalized medicine*. 2014;7:145-62.
6. Gurwitz D, Lunshof J, Dedoussis G, Flordellis C, Fuhr U, Kirchheiner J, et al. Pharmacogenomics education: International Society of Pharmacogenomics recommendations for medical, pharmaceutical, and health schools deans of education. *The pharmacogenomics journal*. 2005;5(4):221-5.
7. Karas Kuzelicki N, Prodan Zitnik I, Gurwitz D, Llerena A, Cascorbi I, Siest S, et al. Pharmacogenomics education in medical and pharmacy schools: conclusions of a global survey. *Pharmacogenomics*. 2019 Jun;20(9):643-57.
8. Murphy JE, Green JS, Adams LA, Squire RB, Kuo GM, McKay A. Pharmacogenomics in the curricula of colleges and schools of pharmacy in the United States. *Am J Pharm Educ*. 2010 Feb 10;74(1):7.
9. Higgs JE, Andrews J, Gurwitz D, Payne K, Newman W. Pharmacogenetics education in British medical schools. *Genomic Medicine*. 2008;2(3-4):101-5.
10. Green J, O'Brien T, Chiappinelli V, Harralson A. Pharmacogenomics instruction in US and Canadian medical schools: implications for personalized medicine. *Pharmacogenomics*. 2010;11(9):1331-40.
11. Owen RP, Klein TE, Altman RB. The education potential of the pharmacogenetics and pharmacogenomics knowledge base (PharmGKB). *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2007 Oct;82(4):472-5.

Bolniku prilagojena laboratorijska medicina pri zdravljenju vnetnih črevesnih bolezni s tiopurini

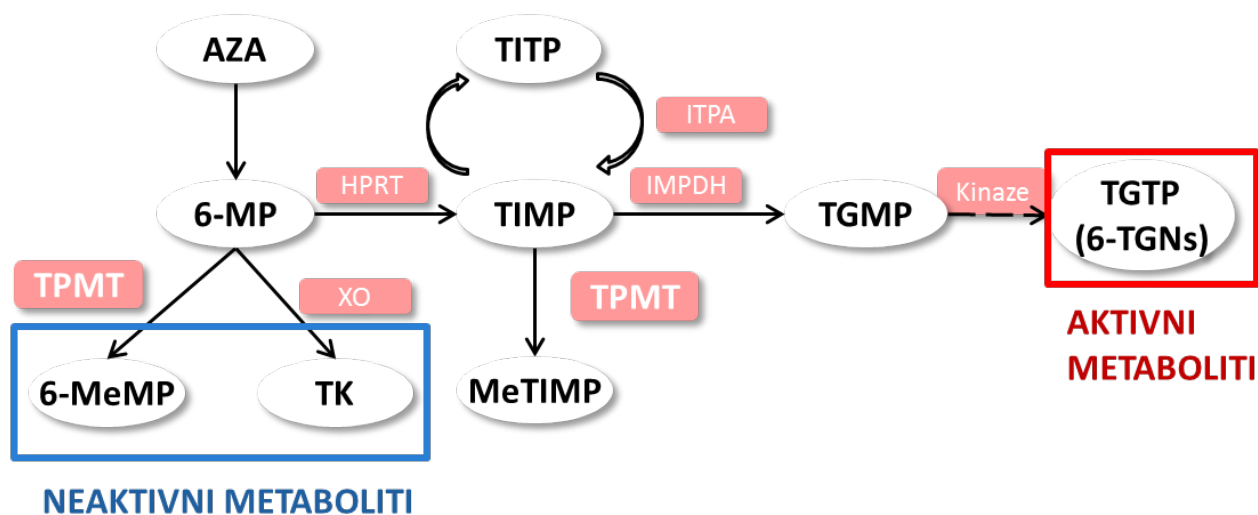
Alenka Šmid, Irena Mlinarič-Raščan

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

Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) je sistemska vnetna bolezen, ki prizadene večinoma prebavni trakt, in za katero so značilni ponavljajoči se vnetni zagoni. Med KVČB uvrščamo Chronovo bolezen (CB), ki lahko prizadene katerikoli del prebavne cevi od ust do zadnjika in pri katerem vnetje običajno prizadene vse sloje stene prebavne cevi, ter ulcerozni kolitis (UK), pri katerem gre za vnetje sluznice, ki se širi od danke navzgor in lahko prizadene celotno debelo črevo. Za zdravljenje KVČB z zdravili se uporabljajo tako standardna kot tarčna biološka zdravila. Med standardnimi imajo pomembno mesto imunosupresivi, in sicer se najpogosteje uporabljata azatioprin (AZA) in

6-merkaptopurin (6-MP), ki sodita med tiopurinske učinkovine, redkeje tudi metotreksat. Tiopurini se praviloma uporabljajo za vzdrževanje remisije KVČB, tudi z namenom zmanjšanja uporabe kortikosteroidov, za zdravljenje fistul pri CB, za preprečevanje ponovnega zagona po operaciji CB in za preprečevanje imunogenosti bioloških zdravil.

Tiopurini so predzdravila, ki za svoje delovanje potrebujejo encimsko aktivacijo. AZA se sprva preko neencimske razgradnje pretvori v 6-MP, nadaljnja presnova pa poteka preko treh glavnih poti (Slika 1).



Slika 1: Poenostavljena shema presnove tiopurinov. 6-MeMP: 6-metilmerkaptopurin;; TGTP: deoksitiogvanozin trifosfat; HPRT: hipoksantin:gvanin fosforiboziltransferaza; IMPDH: inozin monofosfat dehidrogenaza; ITPA: inozin trifosfat dehidrogenaza; MeTIMP: metiltioinozin monofosfat; TGMP: tiogvanozin monofosfat; TIMP: tiinozin monofosfat; TITP: tiinozin trifosfat; TK: tiosečna kislina; XO: ksantin oksidaza; TPMT: tiopurin S- metiltransferaza

Fosforibozilacija s hipoksantin:gvanin fosforiboziltransferazo (HPRT) predstavlja aktivacijsko pot, ki preko številnih vmesnih presnovkov vodi v sintezo aktivnih 6-tiogvanozinov (6-TGN). Po drugi strani predstavljata oksidacija s ksantin oksidazo (XO) in S-metilacija s tiopurin S-metiltransferazo (TPMT) deaktivacijski poti tiopurinov. Pot deaktivacije preko XO je pomembna pri presnovi prvega prehoda, medtem ko je pot deaktivacije preko TPMT, pri čemer nastane neaktivni 6-metilmerkaptopurin (6-MMP), pomembna predvsem v hematopoetskih tkivih.

Kljub dokazani učinkovitosti tiopurinov pri zdravljenju KVČB pa brez prilagoditve odmerka posameznemu bolniku okrog 20 do 30 % bolnikov preneha jemanje tiopurinov zaradi neželenih učinkov, kot so levkopenija, hepatotoksičnost, pankreatitis in gastrointestinalne težave. Za hitrejšo in varnejšo uvedbo zdravljenja ter prilagajanje odmerka posameznemu bolniku, so zdravniku v pomoč laboratorijske preiskave, s katerimi opredeli status TPMT ter spremljanje presnovkov tiopurinov med samim zdravljenjem.

TIOPURIN S-METILTRANSFERAZA

TPMT je citosolni encim, ki se uvršča v družino od S-adenozilmetionina odvisnih metiltransferaz. Gen za TPMT je polimorfen, kar je poglavitni vzrok za veliko variabilnost v encimski aktivnosti TPMT med posamezniki. Porazdelitev aktivnosti v kavkaški populaciji je trimodalna, pri čemer 89–94 % posameznikov izkazuje visoko oziroma normalno, 6–11 % srednjo in 0,3 % nizko encimsko aktivnost. Znanih je že 42 polimorfizmov, najpogostejši in klinično najbolj pomembni, ki so odgovorni za zmanjšano encimsko aktivnost, pa so TPMT*3A (rs1142345 in rs1800460), TPMT*3C (rs1142345), in TPMT*2 (rs1800462). Za določanje polimorfizmov v genu *TPMT* se najpogosteje uporablja genotipizacija s hidrolizirajočimi sondami TaqMan in sekvenciranje po Sangerju. Za merjenje aktivnosti TPMT pa je bilo razvitih več kromatografskih metod, ki se razlikujejo glede na: (a) uporabljen vzorec (eritrociti ali polna kri), (b) uporabljen substrat (6-MP ali 6-TG), (c) pripravo reakcijske mešanice in inkubacije vzorca (z dodatkom ali brez alopurinola kot zaviralca XO, različne koncentracije substrata in donorja metilne skupine ter časa inkubacije), (d) uporabljen detekcijski sistem (UV VIS ali fluorescentni detektor) in (e) normalizacijo rezultatov (na število eritrocitov ali na količino hemoglobina).

Zmanjšana aktivnost TPMT vodi do povečanega nastajanja aktivnih presnovkov, ki lahko delujejo mielotoksično. Za varnejšo uvedbo zdravila je pred zdravljenjem s tiopurini priporočljivo določiti status TPMT bodisi z genotipizacijo *TPMT* ali z merjenjem encimske aktivnosti, ki omogočita prilagoditev začetnega odmerka AZA ali 6-MP. Konzorcij za implementacijo farmakogenomike v klinično prakso

(Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium; CPIC) v svojih smernicah priporoča, naj se pri bolnikih brez variantnih alelov in z normalno encimsko aktivnostjo uvede zdravljenje s standardnim odmerkom AZA/6-MP, pri bolnikih z enim variantnim alelom *TPMT* oziroma s srednjo encimsko aktivnostjo naj se odmerek zmanjša na 30–80 % standardnega odmerka AZA/6-MP, pri bolnikih z dvema variantnima aleloma *TPMT* z zelo nizko aktivnostjo oziroma brez nje pa se uporaba tiopurinov odsvetuje. Poleg posameznikov z zmanjšano aktivnostjo TPMT so tudi takšni z zelo visoko aktivnostjo TPMT. Pri teh je značilna preusmeritev presnove v pretežno nastajanje neaktivnih presnovkov (6-MMP), pri čemer se zelo zmanjša nastajanje aktivnih 6-TGN, kar vodi v slabšo učinkovitost zdravljenja in večje tveganje za pojav hepatotoksičnosti. Kljub prilagoditvi začetnega odmerka AZA/6-MP, se mielotoksičnost in hepatotoksičnost lahko pojavita tudi pri bolnikih z normalno aktivnostjo TPMT in z genotipom *TPMT* divjega tipa. Zato je med samim zdravljenjem potrebno tudi redno spremljanje hemograma, diferencialne krvne slike in hepatograma. Za nadaljnje prilagajanje odmerka in s tem izboljšanje tako učinkovitosti kot varnosti zdravljenja je priporočljivo tudi spremljanje koncentracij presnovkov tiopurinov med samim zdravljenjem.

SPREMLJANJE KONCENTRACIJ PRESNOVKOV AZA/6-MP

Merjenje koncentracije dveh poglavitnih presnovkov tiopurinov, to sta aktivni 6-TGN in neaktivni 6-MMP, je smiselno in priporočljivo 4–6 tednov po uvedbi zdravljenja, ob njegovi nezadostni učinkovitosti ali ob pojavu neželenih učinkov.

Za merjenje koncentracije 6-TGN in 6-MMP je bilo razvitih več kromatografskih metod, najpogosteje pa se uporabljata predvsem dve HPLC metodi z UV VIS detekcijo, ki sta ju razvila Lennard in Singleton (1992) ter Dervieux in Bouliou (1998) [10]. Pri obeh se količini 6-TGN in 6-MMP merita v eritrocitih, razlikujeta se pa predvsem v predpripravi vzorca. Pri prvi metodi priprava vzorca vsebuje dvostopenjsko ekstrakcijo s toluenom, pri drugi pa kislo hidrolizo. Pri obeh so koncentracije 6-TG in 6-MMP podane v $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrocitov. Zaradi dolgotrajne priprave vzorcev in omejene stabilnosti analitov se razvijajo tudi nove metode, med katerimi velja omeniti kvantitativno metodo LC-MS/MS, ki omogoča določanje 6-TGN in 6-MMP v posušeni madeži krvi.

Terapevtsko območje koncentracij 6-TGN pri zdravljenju KVČB z AZA je po podatkih iz literature med 230 in 450 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrocitov. Več študij je pokazalo, da imajo bolniki s koncentracijami 6-TGN nad 230 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrocitov večjo verjetnost za klinični odziv od tistih z nižjimi kon-

centracijami, medtem ko so imeli bolniki s koncentracijami 6-TGN, ki so presegale 450 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrocitov, večje tveganje za pojav mielotoksičnosti. Pri bolnikih s koncentracijami 6-TGN < 230 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrocitov je priporočljivo odmerke tiopurinov povečati, pri tistih s koncentracijami 6-TGN > 450 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrocitov pa zmanjšati.

Spremljanje koncentracij 6-MMP je priporočljivo za oceno tveganja za pojav hepatotoksičnosti, pri čemer koncentracije, višje od 5700 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrocitov po podatkih iz literature nakazujejo večje tveganje. Pri teh bolnikih je ob nespremenjenem odmerku tiopurinov priporočeno pozorno spremljanje jetrnih encimov [8]. Pri bolnikih, ki imajo presnovo usmerjeno predvsem v smer nastanka 6-MMP, in pri katerih je razmerje 6-MMP/6-TG višje od 11, obstaja večje tveganje, da bo zdravljenje neučinkovito. Pri takih zvišanju odmerka ne bo imelo želenega učinka, možno pa je ob zmanjšanju odmerka AZA/6-MP sočasno zdravljenje z alopurinolom, ki deluje kot zaviralec XO. Kljub spremljanju presnovkov med zdravljenjem, ki omogoča prilagoditev odmerka za njegovo večjo učinkovitost in varnost, pa je še vedno potrebno tudi redno spremljanje diferencialne krvne slike in hepatograma, saj se pojavu neželenih učinkov ne moremo popolnoma izogniti.

ZAKLJUČEK

Tiopurini imajo v zdravljenju KVČB kljub prihodu novih bioloških zdravil še vedno pomembno vlogo, predvsem v vzdrževanju remisije bolezni. Zaradi raznolikosti v presnovi tiopurinov med posamezniki je pri nekaterih bolnikih večje tveganje za pojav neželenih učinkov, pri drugih pa za neučinkovitost zdravljenja. Temu se v veliki meri lahko izognemo s posamezniku prilagojenim odmerjanjem zdravila. Tega pred uvedbo usmerjajo analize statusa TPMT (določitev genotipa in/ali merjenje encimske aktivnosti), med

zdravljenjem pa spremljanje koncentracij presnovkov tiopurinov. Tako genotipizacijo *TPMT* kot merjenje koncentracij presnovkov v hemolizatu opravlja Laboratorij za molekularno diagnostiko, ki deluje v okviru Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani.

LITERATURA

1. Pernat Drobež C. Klinične značilnosti ulceroznega kolitisa in Crohnove bolezni. *Gastroenterolog*. 2014 Dec;18(Supplement 1):18–22.
2. Axelrad JE, Roy A, Lawlor G, Korelitz B, Lichtiger S. Thiopurines and inflammatory bowel disease: Current evidence and a historical perspective. *World J Gastroenterol*. 2016 Dec 14;22(46):10103–17.
3. Schwab M, Schäffeler E, Marx C, Fischer C, Lang T, Behrens C, Gregor M, Eichelbaum M, Zanger U, Kaskas B. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics*. 2002 Aug;12(6):429–36.
4. Weinshilboum R. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug Metab Dispos*. 2001 Apr;29(4 Pt 2):601–5.
5. Karim H, Appell ML, Fotoohi A. Comparison of three methods for measuring thiopurine methyltransferase activity in red blood cells and human leukemia cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013 Nov 15;939:80–5.
6. Relling MV, Schwab M, Whirl-Carrillo M, Suarez-Kurtz G, Pui C-H, Stein CM, Moyer AM, Evans WE, Klein TE, Antillon-Klussmann FG, Caudle KE, Kato M, Yeoh AEJ, Schmiegelow K, Yang JJ. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for thiopurine dosing based on TPMT and NUDT15 genotypes: 2018 update. *Clin Pharmacol Ther*. 2018 Nov 17;
7. Blaker PA, Arenas-Hernandez M, Smith MA, Shobowale-Bakre EA, Fairbanks L, Irving PM, Sanderson JD, Marinaki AM. Mechanism of allopurinol induced TPMT inhibition. *Biochem Pharmacol*. 2013 Aug 15;86(4):539–47.
8. Golob S, Drobne D. Azatioprin pri kronični vnetni črevesni bolezni: genotipizacija in metaboliti. *Gastroenterolog*. 2017 Nov;21(2):32–6.
9. Lennard L, Singleton HJ. High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1992 Nov 27;583(1):83–90.
10. Dervieux T, Bouliou R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. *Clinical Chemistry*. 1998 Mar 1;44(3):551–5.
11. Lampič K, Trontelj J, Prosen H, Drobne D, Šmid A, Vovk T. Determination of 6-thioguanine and 6-methylmercaptopurine in dried blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Method development, validation and clinical application. *Clin Chim Acta*. 2019 Dec;499:24–33.
12. Osterman MT, Kundu R, Lichtenstein GR, Lewis JD. Association of 6-thioguanine nucleotide levels and inflammatory bowel disease activity: a meta-analysis. *Gastroenterology*. 2006 Apr;130(4):1047–53.
13. Moon W, Loftus EV. Review article: recent advances in pharmacogenetics and pharmacokinetics for safe and effective thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(8):863–83.
14. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Théorêt Y, Seidman EG. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2000 Apr;118(4):705–13.

Od kromosomov h genom in nazaj – zgodba kronične limfocitne levkemije

Helena Podgornik^{1,2}

¹Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za hematologijo, Ljubljana, Slovenija

²Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Ljubljana, Slovenija

Genomska pokrajina kronične limfocitne levkemije (KLL) je izjemno heterogena, tako kot je raznolik klinični potek te najpogostejše levkemije zahodnega sveta. Začetno znanje o genetskem ozadju KLL izvira neposredno iz analiz proganih kromosomov in sega v sredino devetdesetih let prejšnjega stoletja. Kromosomska analiza je sicer pokazala povezavo med kopičenjem genetskih sprememb in agresivnejšim potekom bolezni, vendar se zaradi težavnosti kariotipizacije pri KLL ni nikoli uveljavila pri rutinski obravnavi bolnikov. Celice KLL so se namreč v gojiščih nerade pomnoževale, kar je vodilo v slabo zaznavnost kromosomskih sprememb. Zaradi tega se je v obravnavi bolnikov s KLL uveljavila tarčna preiskava FISH (fluorescentna *in situ* hibridizacija), s katero določamo štiri ponavljajoče kromosomske spremembe, ki so dokazano povezane z napovedjo poteka bolezni: delecije na kromosomih 11, 13 in 17 (del(11q), del(13q), del(17p)) ter trisomija kromosoma 12. Te spremembe najdemo pri približno 80 % bolnikov s KLL in jih rutinsko določamo pri vseh bolnikih pred uvedbo zdravljenja že skoraj dve desetletji. Z razvojem metod molekularne genetike se je izkazalo, da so mutacije v genu *TP53* za bolnika enako neugodne kot izguba tega gena na kratkem kraku kromosoma 17, ki jo sicer določamo s preiskavo FISH. Zato je v redno obravnavo vstopila tudi analiza tega gena, ki jo izvajamo s sekvenciranjem po Sangerju. Najmlajša genetska preiskava, ki je izkazala močno neodvisno napovedno vrednost pri KLL, je mutacijska analiza gena za težko verigo imunoglobulinov (*IGHV*). Približno polovica bolnikov s KLL ima namreč nemutiran gen *IGHV* in pri teh poteka bolezen bolj neugodno. Ena od presenetljivih lastnosti KLL je tudi t. i. stereotipnost B-celičnega receptorja. V nasprotju s statistično neverjetnostjo, da bi pri več osebah našli enak nabor genov za ta receptor, se vendar srečujemo z nekaj skupinami naborov, ki so ponavljajoče. Tudi to genetsko značilnost preverjamo pred začetkom zdravljenja na osnovi sekvenciranja gena *IGHV*. Zadnje desetletje smo metode molekularne genetike postopoma vpeljevali v rutinsko obravnavo bolnikov s KLL. S prihodom vedno no-

vih tarčnih zdravil namreč postajajo te preiskave ključne za izbiro najprimernejšega zdravljenja in temelj personalizirane obravnave bolnikov s KLL.

V ozadju doslej opisanega diagnostičnega razvoja se je pred 15 leti začela odvijati nova zgodba. Ugotovili so, da kratkoverižna zaporedja DNA (19-25 bp), bogata z nemetiliranimi zaporedji CpG (oligodeoksinukleotidi – ODN), zaradi podobnosti z bakterijsko DNA v kombinaciji z IL-2 pri limfocitih B stimulirajo imunski odziv in ponovno delitev *ex vivo*. Enak učinek, ki je bil opažen pri normalnih limfocitih B, so nato ugotavljali tudi pri maligno spremenjenih. Tako se je v zadnjem desetletju pri gojenju celic KLL začela uporabljati stimulacija limfocitov B z ODN-IL2, s katero dobimo metafaze v ustreznem številu in kakovosti. Novo tehniko gojenja so vpeljali nekateri klinični laboratoriji, pri tem pa se je pojavilo vprašanje, kako pri KLL interpretirati pomen drugih kromosomskih sprememb, predvsem pa njihovo sopojavljanje v večjem številu. V citogenetiki akutnih levkemij (AL) je namreč opredeljeno, da je kompleksno preurejen kariotip tisti, v katerem istočasno najdemo tri ali več neodvisne kromosomske spremembe. Tak kariotip je pri AL nedvoumno povezan z neugodnim potekom bolezni in predstavlja veliko tveganje za bolnika. Ker kompleksno preurejen kariotip ni splošno opredeljen, se je odprlo vprašanje, kaj pa je pri KLL kompleksno. Namen raziskave je bil odgovoriti nanj.

Glede na heterogenost sprememb, ki jih pri KLL srečujemo, je bilo raziskavo mogoče uspešno izpeljati le kot multicentrično. Retrospektivna raziskava je potekala v okviru evropske raziskovalne iniciative za KLL ERIC (**European Research Initiative on CLL**). V raziskavo je 17 evropskih ustanov vključilo 5479 bolnikov s KLL. Vključile so se lahko ustanove, ki so razpolagale s kakovostnimi rezultati standardne citogenetske analize, izvedene na predhodno stimuliranih limfocitih B, s popolnimi podatki preiskave FISH. Na KO za hematologijo, UKC Ljubljana, smo med prvimi, že leta 2012, rutinsko začeli uporabljati nov način

gojenja celic KLL. Poleg kariotipa in rezultatov preiskave FISH, ki so bili znani za vse vključene bolnike, sta bila za dovolj veliko skupino bolnikov znana še dva pomembna napovedna kazalca, namreč mutacije v genu *TP53* ter mutacijski status gena *IGHV*. Za statistične analize o pomenu kompleksnega kariotipa pri KLL so bili potrebni še osnovni demografski podatki o bolniku, opredelitev stadija bolezni po Binetu, čas do začetka zdravljenja ter celokupno preživetje.

Temeljna ugotovitev raziskave je, da je pri KLL z neugodnim potekom bolezni nedvoumno povezan visoko kom-

pleksen kariotip. Ta je tisti, v katerem najdemo 5 ali več neodvisnih kromosomskih sprememb istočasno. Izkazal se je kot najbolj neugoden napovedni dejavnik ne glede na klinični stadij bolezni, spremembe v genu *TP53* oziroma mutacijski status gena *IGHV*. S študijo, objavljeno v reviji *Blood*, ki je opozorila tudi na pomen standardne analize proganih kromosomov pri KLL, smo tako dobili opredelitev kompleksnega kariotipa pri tej bolezni. Analiza proganih kromosomov se z novim kliničnim pomenom vrača med ključne preiskave, ki jih pri bolniku s KLL opravimo pred izbiro najustrežnejšega zdravljenja.

LITERATURA

1. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000 Dec 28;343(26):1910-6.
2. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Sutton LA, Soussi T, Zenz T, Kater AP, Niemann CU, Gonzalez D, Davi F, Gonzalez Diaz M, Moreno C, Gaidano G, Stamatopoulos K, Rosenquist R, Stilgenbauer S, Ghia P, Pospisilova S on behalf of the European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia (ERIC)—TP53 network. *Leukemia*, 2018; 32:1070–1080.
3. Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A, Sutton L-A, Agathangelidis A, Baliakas P, Darzentas N, Giudicelli V, Lefranc M-P, Langerak AW, Belessi C, Davi F and Stamatopoulos K on behalf of ERIC, the European Research Initiative on CLL Leukemia, 2017; 31: 1477–1481.
4. Decker T, Peschel C: Effect of Immunostimulatory CpG-Oligonucleotides in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells, *Leukemia & Lymphoma*, 2001;42(3):301-307
5. Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W: Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status and CD38 expression. *Blood* 2006; 108: 3152-3160.
6. Baliakas P, Jeromin S, Iskas M, Puiggros A, Plevova K, Nguyen-Khac F, Davis Z, Rigolin GM, Visentin A, Xochelli A, Delgado J, Baran-Marszak F, Stalika E, Abrisqueta P, Durechova K, Papaioannou G, Eclache V, Dimou M, Iliakis T, Collado R, Doubek M, Calasanz MJ, Ruiz-Xiville N, Moreno C, Jarosova M, Leeksa AC, Panayiotidis P, Podgornik H, Cymbalista F, Anagnostopoulos A, Trentin L, Stavroyianni N, Davi F, Ghia P, Kater AP, Cuneo A, Pospisilova S, Espinet B, Athanasiadou A, Oscier D, Haferlach C, Stamatopoulos K. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood* 2019, 133(11): 1205-12016.

Bolniku prilagojena laboratorijska medicina na področju hemostaze – prikaz primera

Mojca Božič Mijovski^{1,2}

¹Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za žilne bolezni, Laboratorij za hemostazo in aterotrombozo, Ljubljana, Slovenija

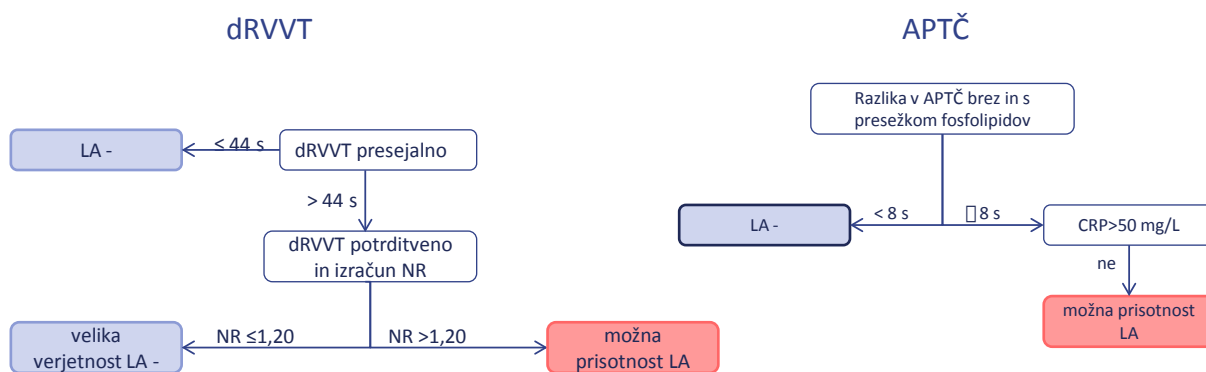
²Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Ljubljana, Slovenija

Antifosfolipidni sindrom (angl. Antiphospholipid syndrome, APS) je avtoimunska bolezen, opredeljena s prisotnostjo antifosfolipidnih protiteles v krvi in kliničnih znakov, kot so zapleti v nosečnosti in tromboze. Za postavitev diagnoze morata biti potrjena vsaj eno klinično in eno laboratorijsko merilo. Ker so klinični znaki povezani z APS pogosti, diagnostika temelji predvsem na laboratorijskih rezultatih. Točnost laboratorijskih rezultatov je ključnega pomena za ustrezno obravnavo bolnikov, saj npr. bolnik z APS v primeru lažno negativnega laboratorijskega rezultata ne bo dobil antikoagulantne zaščite in bo ogrožen zaradi morebitnih tromboz. Po drugi strani bo bolnik brez APS ob lažno pozitivnem rezultatu dobil nepotrebna antikoagulantna zdravila, ki lahko povzročijo krvavitve.

Prisotnost antifosfolipidnih protiteles dokazujemo s pomočjo seroloških in koagulacijskih preiskav. S serološkimi preiskavami ocenimo koncentracije specifičnih protiteles (antikardiolipinskih protiteles in protiteles proti β_2 -glikoproteinu I) ne glede na

njihovo sposobnost vpletanja v procese strjevanja krvi. S koagulacijskimi preiskavami pa zaznavamo le podskupine protiteles, ki zavirajo strjevanje krvi (t. i. lupusni antikoagulanti, LA).

Ugotavljanje prisotnosti LA sodi med najzahtevnejše postopke, ki se izvajajo v specializiranih laboratorijih za hemostazo, saj zaradi heterogenosti protiteles referenčnega materiala ni, nobena od številnih koagulacijskih preiskav sama po sebi ni dovolj občutljiva ali specifična, laboratoriji pa uporabljamo različne strategije pri interpretaciji rezultatov. Na sliki 1 je prikazan algoritem, ki ga za prepoznavanje LA uporabljamo v Laboratoriju za hemostazo in aterotrombozo s pomočjo dveh koagulacijskih preiskav prvega izbora, to sta test z razredčenim strupom Russellovega gada (angl. dilute Russell's Viper Venom Time, dRVVT) in aktivirani parcialni tromboplastinski čas (APTČ). Pozitiven rezultat katerekoli od obeh preiskav je treba potrditi ne prej kot v 12 tednih, saj moramo za postavitev diagnoze APS dokazati trajno prisotnost protiteles.



Slika 1. Algoritem testiranja na prisotnost LA z dRVVT in APTČ v Laboratoriju za hemostazo in aterotrombozo. NR – normalizirano razmerje

Ugotavljanje prisotnosti LA temelji na podaljšanem času ene od koagulacijskih preiskav, ki so odvisne od koncentracije fosfolipidov in na skrajšanju tega časa po dodatku presežka fosfolipidov. Koagulacijske preiskave, ki jih uporabljamo v ta namen, niso občutljive le na LA, pač pa tudi na druge dejavnike, zato za zanesljivo prepoznavanje prisotnosti LA algoritem na sliki 1 ne zadošča. Med najpogostejše dejavnike, ki vplivajo na rezultat, sodijo antikoagulantna zdravila (AKZ). Po priporočilih naj bi bilo testiranje na prisotnost LA opravljeno v času, ko bolnik AKZ ne dobiva, kar pa ni vedno mogoče, saj pri zelo ogroženih bolnikih prekinitve zdravljenja ne pride v poštev, zdravljenje pa lahko traja vse življenje. Vseh vzorcev bolnikov, ki dobivajo AKZ, tako ne moremo preprosto zavrniti kot neustrezne. S takimi vzorci se v laboratoriju srečujemo vsakodnevno, ukrepanje in interpretacija rezultatov pa sta izrazito individualna. Odvisna sta tako od prvega nabora rezultatov kot od vrste AKZ, njegovega odmerka in antikoagulacijskega učinka. Podatek o vrsti in odmerku AKZ je laboratoriju le redko na voljo in nanju sklepamo glede na rezultate laboratorijskih preiskav. Ker so antagonist vitamina K in heparini v uporabi najdlje, imamo o vplivih teh zdravil na laboratorijske preiskave največ znanja in izkušenj. Novejša AKZ predstavljajo večji izziv kljub uvedbi različnih antidotov, ki nevtralizirajo njihov učinek *in vivo* in/ali *in vitro* (idarucizumab, DOAC-Stop™, DOAC-Remove™), a so za vsakodnevno laboratorijsko prakso še premalo preizkušeni. V nadaljevanju je opisan primer iz prakse našega laboratorija.

Primer: v laboratorij smo prejeli vzorec krvi 43-letne bolnice s sumom na APS. Presejalni dRVVT je bil podaljšan, zato smo (po algoritmu na sliki 1) izvedli še potrditvenega in izračunali normalizirano razmerje, ki je bilo 1,30 (re-

renčne vrednosti $< 1,20$). Podatka, da bi bolnica dobivala AKZ, nismo imeli, v primeru povišanega normaliziranega razmerja pa vedno preverimo morebitno prisotnost AKZ. V primeru zdravljenja z antagonistom vitamina K pričakujemo podaljšan protrombinski čas nad 2,0 INR, pri zdravljenju s posrednimi (nefrakcionirani heparin) in neposrednimi (dabigatran, argatroban, ...) zaviralci trombina je podaljšan protrombinski čas (pogosto nemerljivo dolg), pri zdravljenju s posrednimi (nizkomolekularni heparin, fondaparin) in neposrednimi (rivaroksaban, apiksaban, edoksaban) zaviralci koagulacijskega faktorja X pa izmerimo povišane vrednosti kromogene preiskave anti-Xa. Pri bolnici smo izmerili protrombinski čas v terapevtskem območju (2,7 INR), kar je nakazovalo zdravljenje z antagonistom vitamina K. Ker je bilo normalizirano razmerje višje od 1,25, smo opravili test mešanja z normalno zmesno plazmo. Čeprav že normalizirano razmerje nad 1,20 predstavlja patološki rezultat, se pri vrednostih med 1,20 in 1,25 za test mešanja ne odločimo, saj z dodajanjem normalne zmesne plazme ne dodamo samo manjkajočih koagulacijskih faktorjev, ampak tudi razredčimo LA, kar bi lahko vodilo do lažno negativnega rezultata. Bolnični plazmi smo dodali normalno zmesno plazmo v razmerju 1+1. Protrombinski čas te plazme je bil v mejah referenčnih vrednosti, kar pomeni, da smo ustrezno nadomestili manjkajoče koagulacijske faktorje. Izmerili smo tudi presejalni dRVVT (prej 62,6 sekund, po mešanju 37,9 sekund, to je pod razmejitveno vrednostjo 44 sekund), potrditveni dRVVT in izračunali novo normalizirano razmerje (zdaj 1,02, kar je v mejah referenčnih vrednosti). Prisotnost lupusnih antikoagulantov smo na ta način izključili. Na podlagi rezultata so bolnici ukinili AKZ in ponovili testiranje po 12 tednih, ki je potrdilo odsotnost LA.

LITERATURA

1. Žigon P, Božič Mijovski M, Frank Bertonecelj M, Ambrožič A, Tomšič M, Hočevnar A et al. Laboratory Methodology Important in the Diagnosis and Prognosis of Antiphospholipid Syndrome. V: Božič-Mijovski M, ur. Thrombosis, Atherosclerosis and Atherothrombosis. InTech; 2015. p. 105-42.
2. Devreese KM, Antiphospholipid antibody testing and standardization, Int J Lab Hematol 2014;36(3):352-63.

Bolniku prilagojena laboratorijska medicina pri vrojenih motnjah presnove – prikaz primera

Barbka Repič Lampret

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

Konec 20. stoletja sta uporaba novih tehnologij, ki omogočajo pridobivanje velikega števila informacij, ter uporaba bioinformatičnih orodij za obvladovanje teh informacij omogočila razvoj različnih področij celične biologije, kot so genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika, lipidomika, ... Kombinacija rezultatov vseh teh različnih področij nam poda vpogled v razumevanje mehanizmov bolezni, patofiziologije, in predstavlja pomemben korak proti bolniku prilagojeni medicini, ki upošteva raznolikost genov, okolja in načina življenja. Eno od področij, na katerega ima povezovanje metabolomike in genomike pomemben vpliv, je področje vrojenih motenj presnove, kjer sta pravočasna diagnoza in uvedba ustreznega

zdravljenja ključnega pomena za preživetje brez trajnih poškodb ali celo smrti bolnika.

Metode, ki so pomembno pripomogle k razvoju metabolomike in s tem učinkoviti prepoznavi vrojenih bolezni presnove, so nuklearna magnetna resonanca (NMR), plinska kromatografija, združena z masno specifičnim detektorjem (GCMS), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) ter tandemna masna spektrometrija (LS-MSMS). Vsaka ima svoje prednosti in slabosti, je pa pričetek uporabe tandemne masne spektrometrije pri presejalnih testih novorojencev na vrojene bolezni presnove pomenil velik preskok v številu bolezni, ki jih lahko presejamo istočasno.

PRIMER BOLNIKU PRILAGOJENE LABORATORIJSKE MEDICINE PRI BOLNIKI S FENILKETONURIJO

Primer, s katerim lahko lepo predstavimo pomen povezave metabolomike in genomike, je fenilketonurija. Fenilketonurija ima posebno mesto med prirojenimi boleznimi presnove. Bila je prva, pri kateri je bil pojasnjen vzrok duševne zaostalosti (3), prva, pri kateri je bilo uvedeno učinkovito (dietno) zdravljenje (4), in prva, pri kateri je bilo uvedeno presejanje novorojencev.

Fenilketonurija (PKU) je avtosomno recesivna dedna bolezen v presnovi aminokisline fenilalanin. Vzrok bolezni je mutacija gena *PAH*, ki kodira encim fenilalaninska hidroksilaza (PAH), ki katalizira pretvorbo fenilalanina (Phe) v tirozin (Tyr). Kofaktor, potreben za encimsko aktivnost, je tetrahidrobiopterin (BH₄). Gen *PAH* se nahaja na 12. kromosomu in ga sestavlja 13 eksonov. Mutacije gena *PAH* povzročajo različne stopnje pomanjkanja katalitske aktivnosti PAH. Neza-

dostna aktivnost encima je vzrok za povišano vrednost Phe v krvi, to stanje imenujemo hiperfenilalaninemija (HFA). HFA je povezana, če se ne zdravi, s poškodbo osrednjega živčevja, ki se kaže s hudo duševno zaostalostjo. Klasifikacija PKU temelji na presnovnem fenotipu bolnika (glede na stopnjo HFA); razlikujemo tri podvrste PKU (klasična, zmerna in blaga) ter blago HFA, ki je ločena klinična entiteta. Pri klasični PKU je aktivnost encima minimalna ali je ni, pri blagi obliki pa navadno ostane 6 % ali več encimske aktivnosti.

Bolnikom čim prej po rojstvu predpišejo dietno zdravljenje z omejitvijo vnosa Phe, ki je odvisno od presnovnega fenotipa (Tabela 1). Blaga HFA večinoma ne potrebujejo dietnega zdravljenja in spremljanja. Težja je oblika PKU, manjši je dovoljeni vnos Phe oziroma nižja toleranca za Phe.

Tabela 1: Merila za ugotavljanje presnovnega fenotipa pri bolnikih s PKU ali blago HFA.

Presnovni fenotip	Phe v krvi ($\mu\text{mol/L}$) ^a	Vnos Phe (mg/dan) ^b
Normalen	50–120	750–2500 (gs)
Blaga HFA	120–600	600–2500 (gs)
Blaga PKU	600–900	400–600
Zmerna PKU	900–1200	350–400
Klasična PKU	>1200	250–350

^aNajvišja vrednost Phe pred uvedbo diete ali kasneje ob normalni dieti ali ob obremenitvi s Phe.

^bVnos Phe je največja količina Phe v hrani, pri kateri vrednost Phe v krvi še ostaja v ciljnem območju (pod 360 $\mu\text{mol/L}$) in je odvisna tudi od starosti otroka.

ZDRAVLJENJE FENILKETONURIJE

Kakor je bilo že omenjeno, je dietno zdravljenje PKU prvo uspešno zdravljenje vrojenih bolezni presnove. Pričeti ga je treba čim hitreje po rojstvu, saj se vse nastale bolezenske spremembe pojavijo že v prvih mesecih življenja in so nepopravljive (10). Rezultati presejanja novorojencev dokazujejo, da uvedba ustreznega dietnega zdravljenja takoj po rojstvu omogoča normalen razvoj otroka s PKU. Dietno zdravljenje naj bi glede na novejši smernice trajalo vse življenje. Dietno zdravljenje pomeni strogo načrtovano omejitev prehranskega vnosa naravnih beljakovin in s tem Phe. Poleg ustrezne omejitve vnosa naravnih beljakovin je pomembno uživanje mešanice vseh ostalih aminokislin, ki so nujne za normalen razvoj (pripravek aminokislinske mešanice brez Phe). Priporočene vrednosti Phe se razlikujejo glede na starost otrok, še posebno pomembno je skrbno spremljanje Phe v času odraščanja, saj so otroški možgani zaradi hitrega razvoja v prvih letih življenja najbolj občutljivi na visoke vrednosti Phe. Pomembno je tudi redno spremljanje nosečnic s PKU (Tabela 2).

Tabela 2: Priporočene vrednosti Phe v krvi glede na starost

Starost (leta)	Želene vrednosti Phe
do 11	120–360 $\mu\text{mol/L}$
do 18	120–600 $\mu\text{mol/L}$
> 18	do 700 $\mu\text{mol/L}$
Nosečnice s PKU	60–260 $\mu\text{mol/L}$

Pogostost kontrol fenilalanina v krvi je odvisna od oblike bolezni in starosti bolnika. Pri klasični obliki so v prvih mesecih življenja priporočene tedenske kontrole, v zgodnjem otroštvu na 2 tedna, kasneje oz. v adolescenci pa mesečno. Odrasli, ki so na dieti, naj bi kontrolirali fenilalanin v krvi na 1 do 3 mesece, odvisno od strogosti diete. Nosečnice s PKU kontrolirajo raven fenilalanina en- do dvakrat tedensko skozi celo nosečnost.

V zadnjem desetletju pa se za zdravljenje uporablja tudi BH_4 , vendar ni učinkovito pri vseh bolnikih. Učinkovito je predvsem pri blagi obliki PKU, pri kateri je ohranjeno vsaj nekaj encimske aktivnosti, medtem ko pri klasični PKU večinoma ne učinkuje. Razvijata se tudi encimsko zdravljenje (trenutno na voljo v ZDA za odrasle bolnike) in genetsko zdravljenje, ki še nista v klinični praksi, medtem ko se dietno zdravljenje z dolgotrajnimi nevtralnimi aminokislinami z omejeno učinkovitostjo že uporablja, predvsem pri odraslih bolnikih. Poteka tudi študija uporabe genetsko spremenjene bakterije (probiotiki), ki bi zniževala koncentracije Phe.

POVEZAVA MED FENOTIPOM IN GENOTIPOM

Pri nezdravljenih bolnikih s PKU je bila dokazana povezava med genotipom *PAH* in presnovnim fenotipom, kar je pomembno tako za načrtovanje ustrezne diete kakor tudi odzivnosti na zdravljenje z BH_4 . Zdravljenje z BH_4 je primerno za bolnike, pri katerih mutacije v *PAH* ohranijo vsaj delno aktivnost encima, to so predvsem bolniki z blago HFA in blago PKU. V večini primerov lahko napovemo, da pri bolnikih z dvema mutacijama, ki povzročata odsotnost encimske aktivnosti, tudi odziva na zdravljenje z BH_4 ne bo in obratno,

če sta prisotni dve mutaciji, pri katerih je ohranjena vsaj delna encimska aktivnost, lahko z zdravljenjem z BH_4 dosežemo znižanje vrednosti Phe. Pri teh bolnikih lahko omilimo dieto ali jo celo opustimo ter zmanjšamo vnos aminokislinskih mešanic. Odzivnost na zdravljenje z BH_4 je opredeljena kot vsaj 30-odstotno znižanje Phe po 24 urah pri bolnikih, ki so bili pred tem na dieti z normalno vsebnostjo beljakovin ali vsaj povišanim vnosom Phe glede na predpisano dieto.

MALIGNA PKU

V 1–2 % povzročajo HFA vzročne spremembe genov za encime, ki sodelujejo v tvorbi ali regeneraciji BH_4 , kofaktorja encima *PAH*. Rezultat teh sprememb je t. i. maligna PKU, ki jo je treba izključiti pri vseh na novo odkritih bolnikih s HFA. BH_4 je aktivni koencim *PAH*, prav tako BH_4 sodeluje v presnovi dopamina in serotonina. V tem primeru samo dietno zdravljenje z znižanjem koncentracije fenilalanina ne zadostuje, saj se vseeno po tednih ali mesecih začnejo pri otroku pojavljati hude nevrološke težave. Pomanjkanja

BH_4 ne zdravimo z dieto, ampak z zdravili, ki nadomeščajo manjkajoči dopamin in serotonin, ter z visokimi odmerki BH_4 . Zato je pomembno, da pri vsakem novorojencu z ugotovljeno HPA v presejalnih testih, testiramo dodatno še za možno pomanjkanje BH_4 . Napoved izida je odvisna predvsem od zgodnje diagnoze in ustreznega zdravljenja, vendar je zdravljenje pomanjkanja BH_4 manj uspešno kot zdravljenje fenilketonurije.

ZAKLJUČEK

Za učinkovito prepoznavo bolnikov s fenilketonurijo je poskrbljeno s presejalnim testiranjem vseh novorojencev na presnovni ravni, z merjenjem koncentracije fenilalanina. Za nadaljnjo opredelitev in vodenje bolezni ter ugotavljanje odzivnosti na BH_4 sta potrebni tudi genetska diagnostika in izključitev maligne PKU.

Priporočene koncentracije Phe v krvi se spreminjajo glede na starost bolnika. Ravno tako je pomembno, da redno spremljamo koncentracije ostalih esencialnih aminokislin. Glede na redne meritve Phe in ostalih aminokislin je treba sproti prilagajati vnos naravnih beljakovin in aminokislinskega preparata brez Phe ter spremljati prehranski dnevnik

otroka, da zagotovimo tudi zadostni kalorični vnos, vnos mineralov, vitaminov ter esencialnih maščobnih kislin. Bolniki, ki so odzivni na zdravljenje z BH_4 , imajo lahko bolj sproščeno prehrano, kar pozitivno vpliva tako na rast kot tudi na kakovost življenja.

Ob upoštevanju vseh priporočil opredelitve in spremljanja bolezni bomo zagotovili, da bo pravi bolnik prejel pravo zdravlilo ob pravem času v ustreznem odmerku.

LITERATURA

1. Jacob M, Lopata AL, Dasouki M, Abdel Rahman AM. Metabolomics toward personalized medicine. *Mass Spec Rev*. 2017; 1-18.
2. Prodan Žitnik I, Černe D, Mancini I, Simi L, Pazzagli M, Di Resta C, et al. Personalized laboratory medicine: a patient-centered future approach. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(12):1981-1991.
3. Folling A. Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Inbucillat. *Ztschr Physiol Chem* 1934; 227: 169.
4. Bickel H, Gerrard JW, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 1953; 2: 812-9.
5. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; 32: 338-43.
6. Scriver CR. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum Mutat* 2007; 28: 831-45.
7. Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet* 2010; 376: 1417-27.
8. Grošelj U, Žerjav Tanšek M, Trebušak Podkrajšek K, Battelino T. Genetske in klinične značilnosti bolnikov s fenilketonurijo v Sloveniji. *Zdrav Vest* 2013; 82:767-77.
9. Žerjav Tanšek M. Vse kar moramo vedeti o fenilketonuriji. Ljubljana : Društvo za pomoč otrokom s presnovnimi motnjami, 2013.
10. National Institutes of Health Consensus Development Panel. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: phenylketonuria: screening and management. *Pediatrics* 2001; 108: 972-82.
11. Tansek MZ, Groselj U, Murko S, Kobe H, Lampret BR, Battelino T. Assessment of tetrahydrobiopterin (BH(4))-responsiveness and spontaneous phenylalanine reduction in a phenylalanine hydroxylase deficiency population. *Mol Genet Metab* 2012; 107: 37-42.
12. Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G, Grechanina E, Novikov P, McDonald JD, et al. Large neutral amino acids in the treatment of phenylketonuria (PKU). *J Inher Metab Dis* 2006; 29: 732-8.
13. <https://www.the-scientist.com/news-opinion/new-treatments-for-phenylketonuria-aim-to-loosen-reins-on-strict-diet-36699>; dostopano 18.12.2019
14. Thony B, Blau N. Mutations in the BH4-metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropteridine reductase genes. *Hum Mutat* 2006; 27: 870-8.

QC

8. Mednarodna
konferenca
o kakovosti
medicinskih
laboratorijev -
Teorija in praksa
v vodenju
notranje kontrole
kakovosti

Kontrola kakovosti in varnost pacientov – zahteve standarda in referenčni dokumenti

Pika Meško Brguljan

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

VARNOST PACIENTOV IN KAKOVOST MEDICINSKIH LABORATORIJEV

Pravica do kakovostne in varne zdravstvene oskrbe je ena izmed osnovnih pacientovih pravic. V državah EU je zagotavljanje in nenehno izboljševanje kakovosti ter varnosti zdravstvene obravnave prioriteta. Kakovostna zdravstvena oskrba je tista, ki dosledno dosega izide zdravstvene obravnave, ki so primerljivi s standardi ali najboljšimi praksami. Bistvo vodenja kakovosti je sistematično izboljševanje znanja izvajalcev, organiziranosti procesa zdravstvene obravnave, delovnega okolja in vodenja. Kaže se v dvigu uspešnosti zdravljenja, povečani dostopnosti zdravljenja, boljših delovnih pogojih, predvsem pa v večji varnosti. Ta je pomemben element kakovosti in pomeni odsotnost kakršnih koli posledic za paciente, zaposlene ali druge zaradi varnostnih odklonov. Vsi udeleženci v zdravstvenem varstvu morajo tesno in trajno sodelovati pri vzpostavljanju ter vzdrževanju sistemov izboljševanja kakovosti oskrbe in varnosti

pacientov, saj zagotavljanje kakovosti v zdravstvu temelji prav na sodelovanju multidisciplinarnih znanj.

Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je v letu 2019 potrdila 17. september kot svetovni dan varnosti pacientov. Cilj svetovnega dneva je povečati globalno ozaveščenost o varnosti pacientov in razumevanju le-te. Tudi v Sloveniji smo se zavezali, da varnost pacientov priznamo kot ključno zdravstveno nalogo in sprejememo ukrepe za zmanjšanje varnostnih odklonov v zdravstvenih ustanovah. Laboratorijska medicina predstavlja pomemben del prispevka k varni obravnavi pacientov, saj naj bi kar 70 % medicinskih odločitev temeljilo na laboratorijskih izvidih. Tako je kakovost, kompetentnost medicinskih laboratorijev, z obvladovanimi tveganji in čim manj napakami (odkloni), izrednega pomena za varno obravnavo pacientov.

ZAHTEVE STANDARDA IN REFERENČNI DOKUMENTI V POVEZAVI S KONTROLO KAKOVOSTI

Zahteve za kakovost in kompetentnost izvajalcev na področju laboratorijske medicine opredeljujejo pravilniki, standardi, priporočila in smernice. V Sloveniji velja Pravilnik in spremembe pravilnika o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine (Ur. list RS 64/2004, 1/2016, 56/2019), ki ga je objavilo Ministrstvo za zdravje (MZ) Republike Slo-

venije. Zahteve za kakovost in kompetentnost opredeljuje tudi mednarodna standarda, ki sta hkrati slovenska, in sicer SIST EN ISO 15189: 2013 Medicinski laboratoriji – Zahteve za kakovost in kompetentnost in SIST EN ISO 22870: 2016 Testiranje ob pacientu (POCT) – Zahteve za kakovost in kompetentnost.

Za kakovostno delo na področju laboratorijske medicine je potrebno obvladovanje vseh procesov, tako predanaliznih, analiznih, kot poanaliznih. Prepoznavati je treba potencialna tveganja, napake, jih spremljati in imeti vpeljan učinkovit sistem nenehnega izboljševanja. Kakovost v analizi fazi zagotavljamo tako, da uporabljamo preizkušene, v la-

boratoriju verificirane metode, kontroliramo in obvladujemo pa jih s postopki notranje kontrole kakovosti in sodelovanjem v programih zunanje ocene kakovosti ali drugih medlaboratorijskih primerjavah. Zahteve in pristope pri vodenju notranje kontrole kakovosti podrobneje opredeljujejo CLSI standardi in nacionalna priporočila.

GLAVNI PRINCIPI IN STRATEGIJE PRI VPELJAVI KONTROLE KAKOVOSTI

S postopki za obvladovanje kakovosti preverjamo doseganje predvidene kakovosti rezultatov. Eden izmed njih so kontrole kakovosti. Vpeljava in vodenje kontrol kakovosti mora biti načrtovan proces z jasnimi cilji (plan kontrole kakovosti). V pomoč pri postavitvi strategije in ciljev so različna strokovna priporočila in baze podatkov.

Glavni principi so:

- določitev zahtevane kakovosti preiskovanja (analizni in klinični cilji);
- določitev kakovosti, ki jo metoda/preiskava dosega (ovrednotenje izvedbe);
- izbor strategije notranje kontrole kakovosti;
- izbor ustreznih pravil notranje kontrole kakovosti:
 - izbira ustreznega kontrolnega materiala,
 - postavitve ciljnih vrednosti in intervala sprejemljivosti,
 - izbira ustreznega časovnega okvira (frekvenca)

izvajanja,

- ustrezna statistična pravila za vrednotenje izmerjenih vrednosti,
- postopki ukrepanja ob odstopanju kontrol kakovosti (vključno s ponovitvami meritev vzorcev pacientov in s tem povezanimi postopki).

Pomemben vidik zagotavljanja kakovosti je tudi obvladovanje "Lot-to-Lot" variabilnosti reagentov, kalibratorjev, ... in kontrola kakovosti v sistemih mrež laboratorijev.

Novejši pristopi vodenja kontrole kakovosti temeljijo na oceni tveganja, s povezovanjem analiznih zmogljivosti metod s 6 Sigma ovrednotenjem in tveganjem (stabilnost reagentov, število vzorcev, nepravilni rezultati, posledice za pacienta, ...).

Prav tako je pomembno redno pregledovanje doseganja kakovosti metod in učinkovitosti plana kontrole kakovosti.

ZAKLJUČEK

Kakovost in kompetentnost medicinskih laboratorijev, z obvladovanimi tveganji, je izrednega pomena za varno obravnavo pacientov. Kakovostne laboratorijske storitve zagotavljamo z vzpostavitvijo celovitega sistema kakovosti, ki omogoča spremljanje in obvladovanje vseh faz procesa. Kontrola kakovosti je izrednega pomena za zagotavlja-

nje kakovosti laboratorijskih preiskav. Vpeljava in vodenje kontrol kakovosti mora biti načrtovan proces z jasnimi cilji (plan kontrole kakovosti), z upoštevanjem sodobnejših pristopov in priporočil.

LITERATURA

1. <https://www.gov.si/podrocja/zdravje/dostopnost-in-varnost-zdravstvenega-varstva/> (dostop 12. 10. 2019).
2. <https://www.gov.si/novice/2019-09-16-17-september-svetovni-dan-varnosti-pacientov-in-razvoja-kulture-varnosti-v-zdravstvenih-zavodih-govorite-o-varnosti-pacientov/> (dostop 12. 10. 2019).
3. https://www.who.int/features/factfiles/patient_safety/patient_safety_facts/en/ (dostop 12. 10. 2019) (dostop 12. 10. 2019).
4. <https://www.who.int/news-room/campaigns/world-patient-safety-day/2019/> (dostop 12. 10. 2019) (dostop 12. 10. 2019).
5. Gras JM. Laboratory Quality Control and Patient Safety. Walter de Gruyter GmbH, 2017.
6. Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za dovoljenje za delo na področju laboratorijske medicine. Ur. l. 64/04, 1/16, 56/19.
7. SIST EN ISO 15189: 2013 – Medicinski laboratoriji – Zahteve za kakovost in kompetentnost.
8. SIST EN ISO 22870: 2016 – Testiranje ob pacientu (POCT) – Zahteve za kakovost in kompetentnost.
9. ISO/DIS 22367: 2019 – Medical laboratories – Application of risk management to medical laboratories.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Laboratory Quality Control Based on Risk Management; Approved Guideline – First Edition. CLSI document EP23-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document C24. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.
12. Sandberg S, Fraser CG, Horvath AR, Jansen R, Jones G, Oosterhuis W, Hyltoft Petersen P, Schimmel H, Sikaris K, Panteghini M. Defining analytical performance specifications: Consensus Statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Clin Chem Lab Med 2015;53:833–5.
13. Ceriotti F, Fernandez-Calle P, Klee GG, Nordin G, Sandberg S, Streichert T, et al. Criteria for assigning laboratory measurands to models for analytical performance specifications defined in the 1st EFLM Strategic Conference. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2017Jan;55(2).
14. Panteghini M, Ceriotti F, Jones G, Oosterhuis W, Plebani M, Sandberg S. Strategies to define performance specifications in laboratory medicine: 3 years on from the Milan Strategic Conference. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2017Jan;55(12).
15. <https://biologicalvariation.eu/> (dostop 13. 10. 2019).
16. Oosterhuis WP, Bayat H, Armbruster D, Coskun A, Freeman KP, Kallner A, Koch D, Mackenzie F, Migliarino G, Orth M, Sandberg S, Sylte MS, Westgard S, Theodorsson E. The use of error and uncertainty methods in the medical laboratory. Clin Chem Lab Med 2018;56:209–19.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document EP15-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
18. Prezelj M. Priporočila za overjanje (verifikacijo) merilnega postopka in instrumenta v kliničnem laboratoriju, SZKKLM, 2017.
19. Jones G, Calleja J, Chesher D, Parvin C, Yundt-Pacheco J, Mackay M, et al. Collective Opinion Paper on a 2013 AACB Workshop of Experts seeking Harmonisation of Approaches to Setting a Laboratory Quality Control Policy. Clin Biochem Rev. 2015;36(3):87–95.
20. Oosterhuis WP, Coskun A. Sigma metrics in laboratory medicine revisited: We are on the right road with the wrong map. Biochimica Medica. 2018;28(2).
21. Westgard S, Bayat H, Westgard JO. Analytical Sigma metrics: A review of Six Sigma implementation tools for medical laboratories. Biochimica Medica. 2018;28(2).
22. Westgard JO, Westgard SA. Quality control review: implementing a scientifically based quality control system. Annals of Clinical Biochemistry. 2016;53(1):32–50.
23. <https://www.westgard.com/> (dostop 10. 10. 2019).
24. Thelen MHM, Huisman W. Harmonization of accreditation to ISO15189. Clin Chem Lab Med 2018;56:1637–43.

Performance Specifications in Laboratory Medicine

Sverre Sandberg

Norwegian Quality Improvement of Laboratory Examinations (Noklus), Bergen, Norway

How to set analytical performance specifications was discussed on the 1th Strategic conference of EFLM in Milan 2014. Four models were recommended: Model 1: Based on the effect of analytical performance on clinical outcomes. Model 2. Based on components of biological variation of the measurand and Model 3. Based on state-of-the-art. It is recommended that a list be made allocating measurands to different models. Preference should be given to models 1 and 2. In some situations, it can be advantageous to combine the different models.

One of the Task and Finish Groups (TFGs) after the 1th EFLM Strategic conference in 2014 was the TFG of the biological variation database. This TFG should a) develop a critical appraisal check list to evaluate literature on biological variation, to evaluate the literature on biological variation and extract essential information from the papers as well as summarise the information. It should generate a database on the EFLM website with essential information about the biological variation and derived performance specifications for different measurands as well as the evidence behind. The TFG consisted of people interested in the work and was a cooperation between the TFG, the Analytical Quality Commission of the Spanish Society of Clinical Chemistry, the WG of biological variation in EFLM and interested individuals, altogether more than 30 persons. Different groups are established for different measurands. The groups have categorised papers as A, B, C and D depending on their methodological quality, with ca-

tegory A papers indicating high-quality and D poor quality using a checklist that contains 14 items. From each paper 22 items are extracted and presented in the database. The lecture will give a status of the present work.

In addition, the WG on biological variation has collected data from about 100 healthy persons in 6 different European countries and is now generating new biological variation data for a lot of measurands. The results from this study will be compared with data after the literature search.

After the Milan conference, four other TFGs were established: TFG 1: To allocate different tests to different models for estimating performance specifications and to give an overview and a reason for why tests are allocated to the different models; TFG 2: To define performance specifications for the most common measurands that should be used by EQAS organizers; TFG 3: To come up with a proposal for how to use the total error concept and how to possibly combine performance specifications for bias and imprecision; TFG 4: To come up with a general proposal on how to generate performance specifications for the pre- and post-analytical phases. Some of the results from these TFGs will be presented in the lecture.

LITERATURE

1. Sandberg, S., Fraser, C. G., Horvath, A. R., Jansen, R., Jones, G., Oosterhuis, W., et al. (2015). Defining analytical performance specifications: Consensus Statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine : CCLM / FESCC*, 53(6), 833–835. <http://doi.org/10.1515/cclm-2015-0067>
2. Aarsand, A. K., Roraas, T., Fernandez-Calle, P., Ricos, C., Díaz-Garzón, J., Jonker, N., et al. (2017). The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist: A Standard for Evaluating Studies on Biological Variation. *Clinical Chemistry*, clinchem.2017.281808. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2017.281808>
3. Ceriotti, F., Fernandez-Calle, P., Klee, G. G., Nordin, G., Sandberg, S., Streichert, T., et al. (2017). Criteria for assigning laboratory measurands to models for analytical performance specifications defined in the 1st EFLM Strategic Conference. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 55(2), 189–194. <http://doi.org/10.1515/cclm-2016-0091>
4. Jones, G. R. D., Albarede, S., Kessler, D., Mackenzie, F., Mammen, J., Pedersen, M., et al. (2017). Analytical performance specifications for external quality assessment - definitions and descriptions. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 55(7), 949–955. <http://doi.org/10.1515/cclm-2017-0151>
5. Oosterhuis, W. P., Bayat, H., Armbruster, D., Coskun, A., Freeman, K. P., Kallner, A., et al. (2017). The use of error and uncertainty methods in the medical laboratory. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. <http://doi.org/10.1515/cclm-2017-0341>
6. Plebani, M., & phases, E. T. F. O. P. S. F. T. E.-A. (2017). Clinical Biochemistry. *Clinical Biochemistry*, 50(10-11), 550–554. <http://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.02.002>
7. Panteghini, M., Ceriotti, F., Jones, G., Oosterhuis, W., Plebani, M., Sandberg, S., Task Force on Performance Specifications in Laboratory Medicine of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). (2017). Strategies to define performance specifications in laboratory medicine: 3 years on from the Milan Strategic Conference. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 55(12), 1849–1856. <http://doi.org/10.1515/cclm-2017-0772>

Anketa o izvajanju notranje kontrole kakovosti

Katarina Klešnik¹, Saša Bratož¹, Pika Meško Brguljan²

¹Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Ljubljana, Slovenija

²Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Laboratorij za klinično biokemijo in hematologijo, Golnik, Slovenija

Z anketo smo želeli izvedeti, kako medicinski laboratoriji izvajajo notranjo kontrolo kakovosti. Vsebinsko je bila povzeta po anketi prof. Westgarda (The Great Global QC Survey 2017), ki jo je leta 2017 v obsežnejši verziji izvedel v svetu. Pri večini vprašanj smo rezultate ankete primerjali z rezultati na globalni ravni.

Anketo smo izvajali v juliju in avgustu. Poslana je bila dvakrat s tremi opomniki v 242 laboratorijev (60 % laboratoriji v ZD, bolnišnicah in 40 % koncesionarji in zasebni laboratoriji). Odziv je bil dobrih 50 %. Večino odgovorov smo dobili iz laboratorijev javnega zdravstva (v ZD in bolnišnicah) z delovnim časom med 8 in 12 ur dnevno. Število letno opravljenih preiskav je v največji meri od 100.000 do 1.000.000, in sicer so najpogostejše urinske analize, hematološki testi, POCT, testi biokemije, imunokemija, kvantitativni testi, itd.

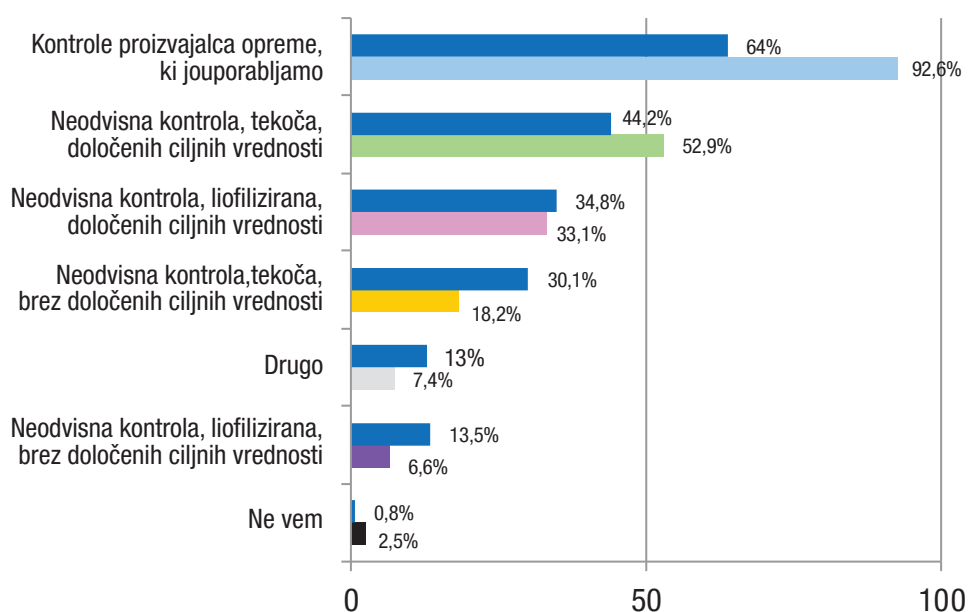
Vprašanja v anketi so bila naslednja:

- Vrsta laboratorija?
- Čas obratovanja laboratorija?
- Število letno opravljenih preiskav?
- Kakšne teste opravljajo laboratoriji?

- Materiali za notranjo kontrolo kakovosti, ki jih uporabljajo laboratoriji?
- Kriteriji za postavitev mej in ciljnih vrednosti notranjih kontrol kakovosti, ki jih uporabljajo laboratoriji?
- Zavrnitveni kriteriji notranjih kontrol?
- Kdaj v dnevu laboratorij izvaja notranjo kontrolo kakovosti?
- Pogostnost izvajanja notranje kontrole kakovosti?
- Vplivi na pogostnost izvajanja kontrol kakovosti?
- Vodenje (zapisi, sledljivost, statistika, poročila) notranje kontrole kakovosti?
- Postopanje laboratorijev v primeru izpada notranje kontrole kakovosti in že analiziranih vzorcev?
- Upravljanje stroškov kontrol?

Odgovori oziroma rezultati so bili v obeh anketah zelo primerljivi. Podrobneje sta spodaj predstavljeni vprašanja, pri katerih so bila odstopanja očitna in vprašanja o pogostosti kontrol ter vplivih na njihovo pogostost.

Kakšne materiale za notranjo kontrolo kakovosti uporabljate? (možnih več odgovorov hkrati)



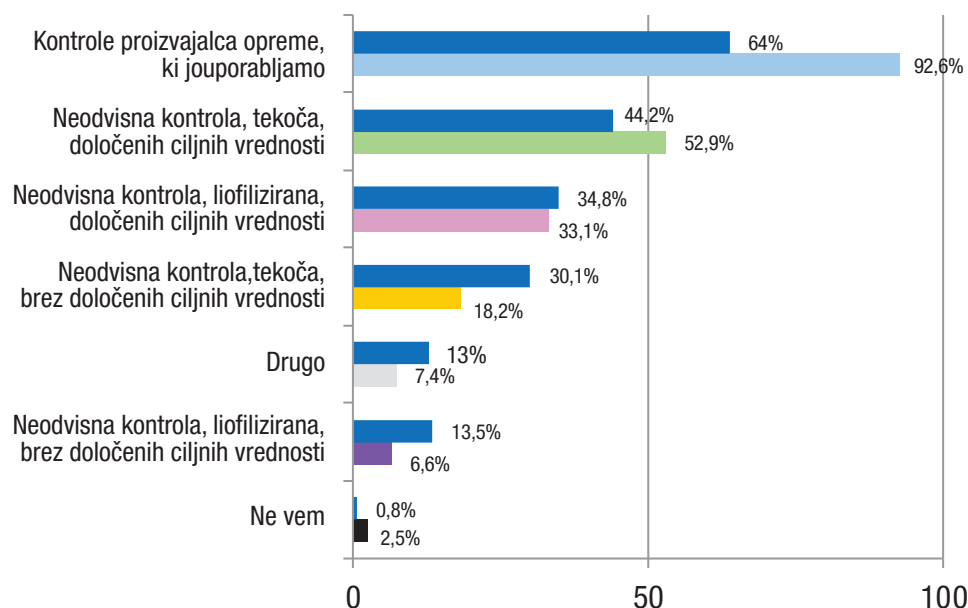
Slika 1: vrste materialov za notranjo kontrolo

Opomba: ■ označeni rezultati ankete prof. Westgarda

Najpogosteje se uporablja kontrolni material proizvajalca opreme (92,6 %), sledita uporaba neodvisne tekoče kontrole z določenimi vrednostmi (52,9 %) ter neodvisna liofilizirana kontrola določenih vrednosti (33 %). Manj se uporablja ta neodvisni kontroli nedoločenih vrednosti (tako tekoča – 18,2 %, kot liofilizirana – 6,6 %). Rezultati so primerljivi z dobljenimi rezultati ankete prof. Westgarda. Tudi v svetu

64 % laboratorijev uporablja kontrolo kakovosti proizvajalca opreme. Razmisliti velja o uporabi kontrolnih materialov tretjih strank namesto ali dodatno h kontrolnim materialom proizvajalca. Z uporabo neodvisnih kontrolnih materialov zagotovimo, da s kontrolo dobimo neodvisno oceno izvedbe merilnega postopka v celoti, vključno s kalibracijo meritve.

Katere kriterije za postavitev mej in ciljnih vrednosti notranjih kontrol kakovosti uporablja laboratorij? (možnih več odgovorov hkrati)



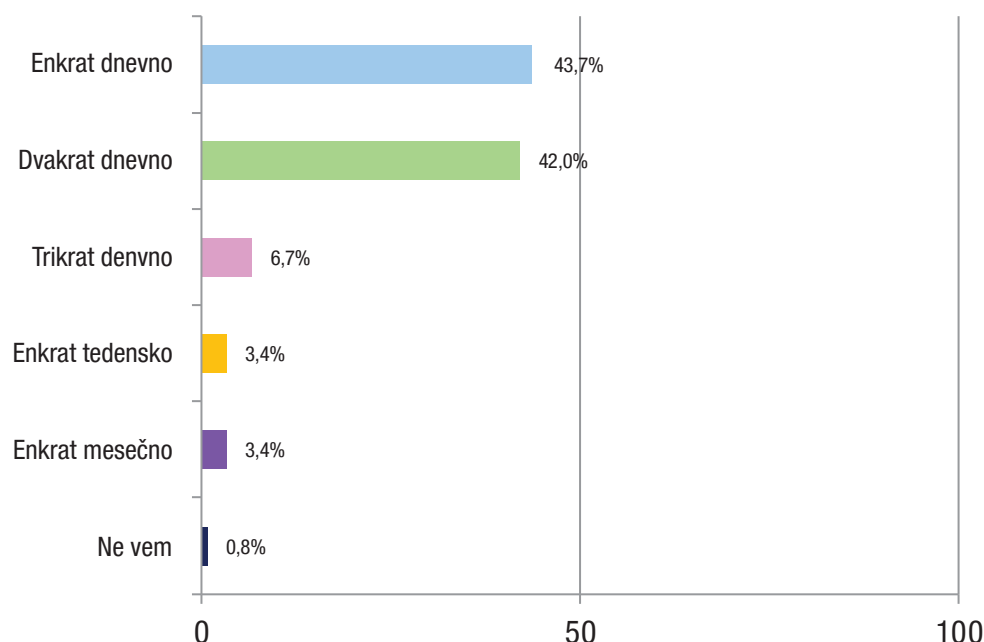
Slika 2: kriteriji za postavitev mej in ciljnih vrednosti notranjih kontrol kakovosti

Opomba: ■ označeni rezultati ankete prof. Westgarda

Večina laboratorijev (89,3 %) uporablja proizvajalčeve vrednosti. Sledi uporaba srednje vrednosti in SD na podlagi lastnih vrednosti izvedbe v dobrih 36 %. Sledijo povzete meje od 'peer' skupine iz interlaboratorijskega programa vodenja kontrol kakovosti v 26 %. Ostali kriteriji se uporabljajo v precej manjšem obsegu. Iz rezultatov sklepamo, da se uporablja več kriterijev hkrati. V primerjavi z Westgardovo anketo sta prvi dve postavki ravno zamenjani. V svetu kar 62,5 % laboratorijev uporablja srednje vrednosti in SD na podlagi lastnih vrednosti izvedbe ter polovica manj (43 %) kot pri nas proizvajalčeve vrednosti. Seveda tudi v

tujini uporabljajo več kriterijev hkrati. Rezultati ankete kažejo, da je pri nas precejšen delež laboratorijev, ki uporablja izključno proizvajalčeve vrednosti. Pri odgovoru, da se uporablja za določitev mej kontrol kakovosti v dobrih 6 % merilna negotovost, se ne hote pojavi vprašanje pravilnega razumevanja ponujenega odgovora na to vprašanje.

Kako pogosto izvajate notranjo kontrolo kakovosti?

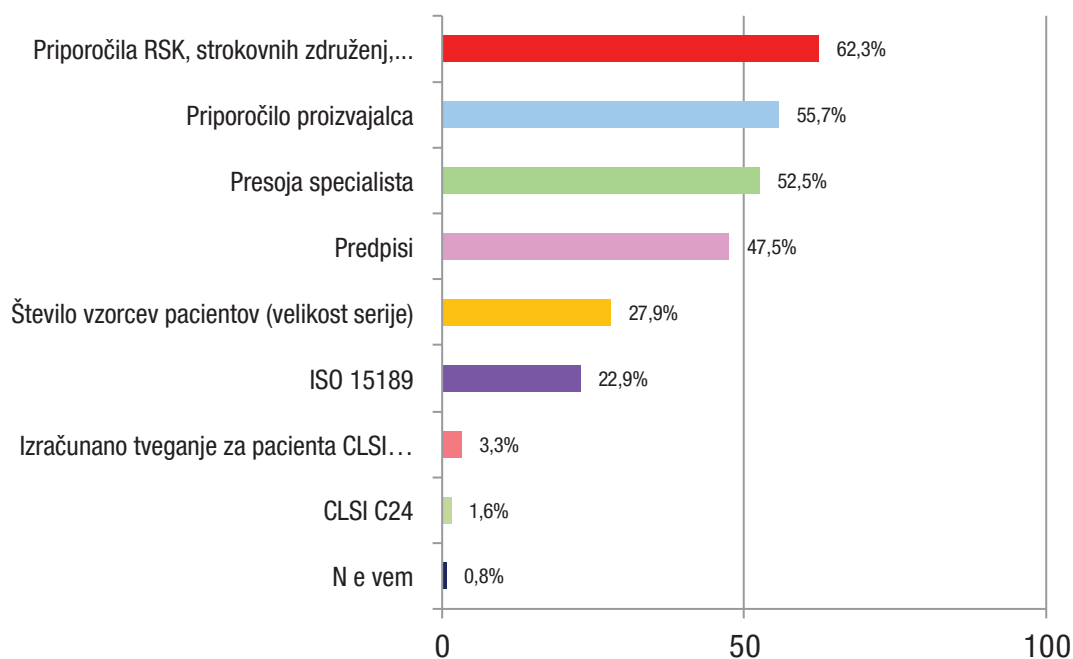


Slika 3: pogostost izvajanja kontrol

Večina (43,78 %) kontrolo kakovosti izvaja enkrat dnevno. Dvakrat dnevno kontrolo opravlja 42 %, trikrat dnevno pa samo slabih 7 % laboratorijev. Glede na to, da smo pri času obratovanja prejeli rezultate, da 8–12 ur na dan dela 58 % laboratorijev, 24 ur/dan pa 13,22 %, je odstotek trikrat dnevno izvajanih kontrol kakovosti nizek. Sprejeta priporočila RSK nalagajo laboratorijem za izvajanje osnovnih biokemijskih preiskav najmanj dvakrat dnevno analizo kontrolnega materiala.

Za POCT notranjo kontrolo kakovosti izvajamo vsaj z enim kontrolnim vzorcem na vsakem aparatu vsak dan pred začetkom testiranja vzorcev pacientov (SZKK, Priporočila za organiziranje in izvajanje laboratorijskih testov ob pacientu, Marija Prezelj in Saša Bratož).

Kaj vpliva na pogostost izvajanja kontrol? (možnih več odgovorov hkrati)



Slika 4: vplivi na pogostost izvajanja kontrol

Najpogostejši so: priporočila RSK, strokovnih združenj (62 %), priporočila proizvajalca (56 %), presoja specialista (52,5 %) ter predpisi (47,5 %). S precej manj odstotki sledijo ostali možni odgovori. Pogostost kontrol se v največji meri izvaja po priporočilih RSK, ki niso enkrat dnevno, razen za POCT.

Zaključki ankete, v kateri smo želeli dobiti okvirno sliko izvajanja notranjih kontrol kakovosti v slovenskih laboratorijih, kažejo:

- potrebo po uporabi novejših pristopov k vodenju notranje kontrole kakovosti,
- potrebno bo razmisliti o večji uporabi tudi neodvisnih zunanjih kontrol,
- v laboratorije uvesti več meril za določitev ciljnih in mejnih vrednosti notranjih kontrol kakovosti ter meril za zavrnitev kontrol kakovosti,
- stremeti k pogostejšemu izvajanju notranjih kontrol kakovosti, glede na kakovost metode in ocenjeno tveganje za paciente,
- kolikor se le da, posodobiti vodenje zapisov notranjih kontrol kakovosti ter podatkov, ki jih spremljajo,
- obvladovati stroške notranjih kontrol kakovosti na osnovi strokovnih meril, z ustreznimi nabavnimi postopki, ...
- posodobitev priporočil o notranji kontroli kakovosti.

LITERATURA

1. Slovenski standard SIST EN ISO 15189:2013/AC101, Slovenski inštitut za standardizacijo
2. <https://www.westgard.com/great-global-qc-survey-results.htm>
3. Basic QC Practices, 3rd Edition, James O. Westgard, Ph.D,
4. CLSI C24-A3, Vol. 0 No. 0, Replaces C24-A2, Vol. 19 No. 5, Clinical and Laboratory Standards Institute
5. A Practical Guide to Internal Quality Control for Quantitative Tests in Medical Laboratories, Version 2.0, Edited by Richard Pang, PhD, FACB, Senior Consultant Pro Q Consulting Services for Hong Kong Association of Medical Laboratories Limited, February 2015

Izkušnje vodenja notranje kontrole kakovosti iz prakse – Klinika Golnik

Rok Kogovšek, Marsel Bratuša, Pika Meško Brguljan

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

Standard ISO 15189:2013 (Medicinski laboratoriji – Zahteve za kakovost in kompetentnost) v točki 5.6.2.1 navaja, da mora laboratorij zasnovati postopke za obvladovanje kakovosti, s katerimi preverja doseganje predvidene kakovosti rezultatov. Eden izmed pomembnejših členov v sistemu obvladovanja kakovosti so notranje kontrole kakovosti. Sistem notranjih kontrol kakovosti zajema vse od postavitve analitskih in kliničnih ciljev, ovrednotenja analitske izvedbe, izbire ustreznega kontrolnega materiala, postavitve ciljnih vrednosti in intervala sprejemljivosti, izbire ustreznega časovnega okvira izvajanja, ustreznih statističnih pravil za vrednotenje izmerjenih vrednosti ter postopek ukrepanja ob odstopanju kontrol kakovosti.

V Laboratoriju za klinično biokemijo in hematologijo Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik smo pred tremi leti v sklopu priprav na pridobitev akreditacije, skladne z zahtevami standarda SIST EN ISO 15189:2013, nadgradili obstoječi sistem vodenja notranjih kontrol kakovosti. Z novim sistemom vodenja smo vse analizatorje povezali v enoten program, preko katerega enovito, standardizirano in sledljivo obvladujemo rezultate notranjih kontrol kakovosti. Z njimi preverjamo in zagotavljamo zanesljivost naših rezultatov na podlagi:

kontinuiranega dnevnega preverjanja ustreznosti izmerjenih vrednosti kontrol kakovosti in s tem tudi ustreznost izdanih rezultatov.

Pri preiskavah, ki jih opravljamo, smo postopoma pričeli z vpeljevanjem intervalov lastnih ciljnih vrednosti, ki jih uporabljamo poleg obstoječih proizvajalčevih (± 2 standardni deviaciji). Na intervale lastnih ciljnih vrednosti smo določili individualizirana statistična (Westgardova) pravila. Določili smo jih glede na analitske karakteristike posamezne preiskave. To smo ocenili z izračunom po metodologiji šest sigma, na podlagi vnaprej določene celokupne dovoljene napake (TEa), pristranosti (bias), pridobljene iz primerjav glede na skupino uporabnikov z enakimi sistemi (peer

group), analitski koeficient variacije (CV) in glede na število dnevno izvedenih kontrol kakovosti.

Primerjava meritev med različnimi analizatorji, ki opravljajo enake preiskave.

Z omenjenim programom dnevno primerjamo vrednosti kontrol kakovosti za enake preiskave med različnimi analizatorji, s pomočjo prekrivanja kontrolnih kart ter samodejnim izračunom statističnih razlik med njimi. Navedeni način pregledovanja dnevnih kontrol kakovosti je dober kazalec primerljivosti med analizatorji, ki ga uporabljamo poleg periodičnega testiranja primerljivosti z naključnimi vzorci preiskovancev.

Preverjanje ustreznosti delovanja.

S kontrolami kakovosti preverjamo ustreznost izvedbe različnih posegov na analizatorju (redna in korektivna vzdrževanja), prav tako v program beležimo testiranja ustreznosti reagentov ob menjavah. Program smo prilagodili tudi za beleženje ustreznosti barvanja hematoloških razmazov, ki jo ocenimo pod mikroskopom in nato z ustreznim komentarjem zabeležimo.

Izračun merilne negotovosti.

Merilno negotovost ocenjujemo v šestmesečnih časovnih intervalih. Program omogoča izračun standardne merilne negotovosti, glede na standardno deviacijo posamezne preiskave oziroma kombinirane merilne negotovosti, pri kateri upošteva še bias metode in merilno negotovost kalibratorja. V laboratoriju trenutno ocenjujemo merilno negotovost glede na standardno deviacijo, izračunane vrednosti pa nato primerjamo z vnaprej postavljenimi merili sprejemljivosti in izračuni predhodnih obdobj.

S primerjavo analitskih značilnosti biokemijskih preiskav iz

leta 2017, ko smo pričeli z vpeljevanjem novejšega pristopa, ter letom 2019, v katerem omenjene pristope že uporabljamo v sklopu rutinskega dela, ugotavljamo izboljšanje analitskih značilnosti pri posameznih preiskavah. To je razvidno iz povprečno nižjih celokupnih analitskih koeficientov variacije in višjih šest sigma vrednosti.

V prihodnje nas čaka v laboratoriju več izzivov s področja vodenja kontrol kakovosti, saj želimo na podlagi že uspeš-

no implementiranih novejših pristopov le-te še nadgraditi. Dodatno bomo poskušali vpeljati lastne ciljne vrednosti še za preostale preiskave. Želimo doseči tudi popolno brez-papirno vodenje kontrol kakovosti, zato bomo postopoma ukinjali tiskanje dnevnih izpisov njihovih rezultatov, saj s podporo sodobnega programa lahko zagotovimo popolno sledljivost notranjih kontrol kakovosti in izvedbo korektivnih ukrepov ob njihovih odstopih.

LITERATURA

1. Burnett D. A practical guide to ISO 15189 in laboratory medicine. ACB Venture Publications; 2013.
2. Ceriotti F, Fernandez-Calle P, Klee GG, Nordin G, Sandberg S, Streichert T, et al. Criteria for assigning laboratory measurands to models for analytical performance specifications defined in the 1st EFLM Strategic Conference. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2017Jan;55(2).
3. Gras JM. Laboratory quality control and patient safety. Berlin/Boston: De Gruyter; 2017.
4. ISO 15189. Medical laboratories - Requirements for quality and competence. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2013.
5. Jones G, Calleja J, Cheshier D, Parvin C, Yundt-Pacheco J, Mackay M, et al. Collective Opinion Paper on a 2013 AACB Workshop of Experts seeking Harmonisation of Approaches to Setting a Laboratory Quality Control Policy. *Clin Biochem Rev*. 2015;36(3):87–95.
6. Oosterhuis WP, Coskun A. Sigma metrics in laboratory medicine revisited: We are on the right road with the wrong map. *Biochemia Medica*. 2018;28(2).
7. Panteghini M, Ceriotti F, Jones G, Oosterhuis W, Plebani M, Sandberg S. Strategies to define performance specifications in laboratory medicine: 3 years on from the Milan Strategic Conference. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2017Jan;55(12).
8. Westgard JO, Westgard SA. Quality control review: implementing a scientifically based quality control system. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2016;53(1):32–50.
9. Westgard S, Bayat H, Westgard JO. Analytical Sigma metrics: A review of Six Sigma implementation tools for medical laboratories. *Biochemia Medica*. 2018;28(2).

Izkušnje vodenja notranje kontrole kakovosti iz prakse – KIKKB, UKC LJ

Kristina Kumer, Marjana Prah Krumpak, Saša Bratož

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

Pri zagotavljanju kakovosti mora medicinski laboratorij sistematično izvajati vse dejavnosti, ki vodijo v izpolnjevanje zahtev za kakovost laboratorijskih rezultatov in zagotavljajo zaupanje v zanesljivost izvidov. Pri tem mora preučiti vse tiste vire variabilnosti, ki so v pristojnosti medicinskega laboratorija in izvajati postopke, ki so potrebni za njihovo prepoznavanje in zmanjševanje, vključno z vsemi vzroki, ki se pojavijo od trenutka priprave pacienta na odvzem vzorca, do izdaje izvida in časa uporabe informacije na izvidu. Pomembno je, da vsak laboratorij sam vzpostavi ustrezne postopke za obvladovanje kakovosti, s katerimi preverja doseganje predvidene kakovosti rezultatov, kar je tudi zahteva standarda ISO 15189.

Medicinski laboratorij dosega kakovost svojih rezultatov z izvajanjem notranje in zunanje kontrole kakovosti. Notranja kontrola kakovosti (IQC) nam omogoča oceniti predvsem ponovljivost rezultatov vzorcev pacientov in tako pomaga pri odločitvah, ali so rezultati ustrezni za izdajo, medtem ko zunanja kontrola kakovosti (EQC) omogoča predvsem pravilnost in medlaboratorijsko primerljivost. Sistem notranje kontrole kakovosti se skozi leta posodablja, a kljub vsej dolgoletni praksi še vedno nimamo enotnega, idealnega sistema.

Priporočeno je uporabiti stabilne kontrolne vzorce, ki imajo enak matriks kot vzorci pacienta, saj bodo le tako posnemali vzorce pacienta oziroma reagirali na enak način. Izbira števila nivojev IQC mora pokriti celotno analizno območje. Priporočena je uporaba neodvisnih kontrolnih vzorcev, t. i. »third party«, s katerimi lahko zaznamo tudi spremembe, povezane z različnimi loti reagentov ali kalibratorjev.

Pomembno je, da kontrolne vzorce analiziramo dovolj pogosto. Pogostnost kontrol ni standardizirana. Najpogostejše zapisano splošno priporočilo je izvajanje kontrole pred pričetkom analize vzorcev pacientov dela in potem po zaključku dela ali pa, če se medtem zamenja lot reagentov in po vzdrževanju ter servisnih posegih. ISO 15189 navaja le, da je treba

pogostnost kontrol prilagoditi glede na stabilnost merilnega procesa (preiskovalnih postopkov) in oceno tveganja škode za pacienta, ki bi nastala v primeru nepravilnih rezultatov. Novejša priporočila navajajo, naj pogostnost kontrol določimo tudi glede na število analiziranih vzorcev ob upoštevanju nastalih stroškov, ki bi nastali zaradi ponovne analize vzorcev pacientov v primeru izpadlih kontrol. Hkrati je treba upoštevati tudi značilnosti operaterja, kot tudi stabilnost analita. Ponavljanje meritve nestabilnega analita v istem vzorcu čez določen čas je brezpredmetno in lahko celo zavajajoče.

Pomembna je tudi jasna opredelitev načina spremljanja rezultatov, meril sprejemljivosti oziroma zavrnitev in postopke, kako ukrepati ob izpadu kontrole.

Še vedno laboratoriji uporabljajo meje proizvajalca, ki pa so običajno preširoke za delo v naših pogojih (dva- do trikrat večje), kar pomeni, da je velika verjetnost, da klinično pomembnih napak ne bomo odkrili. Več kot polovica laboratorijev po svetu uporablja za mejo kontrol povprečno vrednost $\pm 2SD$, kar pomeni veliko lažnih zavrnitev, saj je pri uporabi dveh nivojev stopnja lažnih zavrnitev kar 10 %. Lažne zavrnitve predstavljajo velik strošek v laboratoriju. Pri meji $3SD$ in številu uporabljenih kontrol 2–4 je lažnih zavrnitev 1 %, vendar je zaznava napake nizka, kar pomeni, da medicinsko pomembnih napak lahko ne odkrijemo. Meje proizvajalca so tako lahko le osnovno vodilo, vsak laboratorij pa mora postaviti lastne meje oziroma merila za oceno kakovosti rezultatov pacientov. Vsak laboratorij naj bi po priporočilih pred začetkom uporabe novega lota kontrol postavil lastne vrednosti (CLSI: vsaj 20 meritev, 4 meritve/dan, 5 različnih dni). Lastne meje postavimo na osnovi izračunane povprečne vrednosti ($\bar{x}$), standardnega odklona (SD) in koeficienta variacije (CV). Pomembno je, da zadani cilji niso previsoki. Želimo odkriti le klinično pomembne napake, ne pa lažnih alarmov, ki pomenijo nepotrebno delo in dodatne stroške. Rezultate kontrol moramo redno spremljati in glede na kumulativne podatke daljšega časovnega obdobja meje po potrebi spremeniti.

Spremljanje rezultatov IQC je danes olajšano, saj so na voljo različna orodja. Večinoma uporabljamo grafični prikaz (Levey-Jenningsov graf). V ta namen lahko uporabljamo tudi računalniške programe, ki omogočajo različne izračune in statistične analize (merilna negotovost, Sigma metrika, celokupna dovoljena napaka, primerjava z drugimi laboratoriji (Peer Group)). Tako lahko na enostaven način izberemo cilje, opazujemo trende in opazimo napake, ki so posledica sistema ali pa naključne. Računalniški programi omogočajo tudi beleženje dogodkov (zamenjava žarnice in elektrod, serije reagenta in kalibratorja, servis, ...). Slabost programov je, da je lahko malo uporabnikov za določene parametre in je tako medlaboratorijska primerjava lahko zavajajoča, kot drugo pa program predstavlja določen strošek.

Rezultate IQC ocenimo na podlagi vnaprej postavljenih pravil, najpogosteje Westgardovih. Westgard priporoča uporabo vsaj dveh nivojev kontrol istočasno (angl. Per run) in več pravil – »Multi rule« pristop. Tak pristop izboljša zaznavo napak z majhno verjetnostjo lažnih zavrnitev, kar je naš cilj. V primeru odstopanj od zadanih ciljev prenehamo z analiziranjem vzorcev, poiščemo vzrok napake in jo odpravimo.

Pri določanju pogostnosti in izboru pravil si lahko pomagamo z različnimi orodji (angl. Power function graph, Sigma metric critical error graphs, Charts of operating specifications, Westgard Sigma Rules). Six Sigma je primer orodja, s katerim lahko planiramo IQC in ocenimo, ali je naša metoda ustrezna za klinično uporabo. Uspešnost metode se meri s stopnjo sigme, pri čemer sigma pod 3 pomeni veliko verjetnost napak in zato neustreznost postopkov, sigma med 3 in 6 kaže na zadovoljivost postopkov, pri katerih pa je treba uvesti izboljšave, sigma 6 ali več pa pomeni odličnost postopkov, pri katerih so lahko naša pravila ohlapnejša. Z dvigom stopnje sigme eksponentno pada število napak.

Na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB) smo izračunali sigma metriko ($\text{Sigma} = (\text{TEa} - \text{BIAS})/\text{CV}$) upoštevajoč različna merila in podatke. Zanimalo nas je, kaj se zgodi, če uporabljamo različne podatke za izračun BIAS-a in CV.

Primeljali smo rezultate analiz SNEQAS-a in INSTAND-a za leto 2018 za šest izbranih biokemičnih parametrov (glukoza, natrij, urat, kreatinin, proteini, alkalna fosfataza). Iz SNEQAS-a smo vzeli merilo za celokupno analitično napako (TEa). Za izračun CV smo vzeli rezultate IQC (povprečje dveh nivojev) in sicer za obdobje enega meseca in treh mesecev. Za izračun BIAS-a smo najprej vzeli podatke iz INSTAND-a, in sicer smo ga izračunali na podlagi ciljne vrednosti, ki jo določijo z referenčno metodo (TV), in na podlagi ciljne vrednosti, ki jo določijo po posameznih skupinah glede na metodo/aparat (PG). Pri SNEQAS-u je BIAS izračunan glede na ciljno vrednost, ki jo določijo po skupinah glede na metodo. Rezultati so pokazali različna odstopanja, odvisno, s katero skupino smo jih primerjali (*Preglednica 1*). Temu primerne so tudi razlike v sigmah, ki bi v našem primeru, ko pogledamo INSTAND, večji vpliv na planiranje IQC imele samo v primeru natrija. Če primerjamo rezultate sigma med INSTAND in SNEQAS vidimo, da bi pri planiranju IQC prišlo do spremembe pri glukozi, natriju in kreatininu. Primerjali smo tudi CV, izračunane v obdobju treh mesecev in enega meseca. Glede na to, da trimesečno obdobje pomeni več možnosti za variabilnost, smo pričakovali višje CV kot v enomesečnem obdobju. Izkazalo se je, da ni vedno tako (natrij, urat, kreatinin), saj je pri enomesečnem CV v teh primerih sigma višja. Torej, če želimo na osnovi sigme določiti pravila in pogostnost izvajanja IQC, da bi zaznali vse pomembne napake, ne pa tudi tistih, ki nimajo kliničnega pomena, se lahko srečamo s težavami.

Preglednica 1: Prikaz razlik v izračunu sigma metrike, glede na uporabljene podatke (INSTAND vs. SNEQAS in CV 1 mesec vs. CV 3 meseci)

MERJENEC			INSTAND				SNEQAS			
	TEa	CV	BIAS		Sigma		BIAS	Sigma	CV	Sigma
	SNEQAS	3M	PG	TV	PG	TV	PG	3M	1M	1M
Glukoza	10	2,49	1,20	2,13	3,54	3,17	2,90	<3	1,19	5,97
Natrij	5	1,01	0,86	1,03	4,10	3,94	1,43	3,53	1,04	3,43
Urat	10	1,43	2,55	1,63	5,21	5,86	1,69	5,81	1,62	5,15
Kreatinin	10	1,53	5,47	9,13	<3	<3	2,75	4,74	1,93	3,77
Proteini	10	1,40	1,31	0,48	6,23	6,83	0,93	6,51	0,81	11,20
Alkalna fosfataza	20	3,07	2,10	2,18	5,84	5,82	1,66	5,98	2,33	7,87

Pogledali smo tudi, kakšne so razlike v sigmah, izračunane glede na različna merila za dovoljeno celokupno napako (Preglednica 2). BIAS smo izračunali iz rezultatov

SNEQAS-a, CV iz podatkov IQC za obdobje treh mesecev. Tudi tukaj so se pokazale razlike, torej je zelo odvisno, kakšno merilo izberemo. Strožje kot je, slabša je sigma.

Preglednica 2: Prikaz razlik v izračunu sigma glede na različna merila za dovoljeno celokupno napako

MERJENEC	TEa [%]				Sigma			
	SNEQAS	CLIA	RICOS	RILIBAK	SNEQAS	CLIA	RICOS	RILIBAK
Glukoza	10	10	6,96	15	<3	<3	<3	4,87
Natrij	5	4	0,73	5	3,53	<3	<3	3,53
Urat	10	17	11,97	13	5,81	10,71	7,19	7,91
Kreatinin	10	15	8,87	20	4,74	8,01	4,00	11,28
Proteini	10	10	3,63	10	6,51	6,51	<3	6,51
Alkalna fosfataza	20	30	12,04	18	5,98	9,25	3,39	5,33

Pogledali smo tudi, kakšna pravila, pogostnost in število kontrol bi glede na teorijo morali uvesti v naš sistem IQC. Poleg sigme smo izračunali indeks QGI (Quality goal index = $\text{BIAS}/1,5 \times \text{CV} \%$), s pomočjo katerega lahko ugotovimo, ali je težava samo v nenatančnosti ali/in v netočnosti. V našem primeru je kar pri štirih izmed šestih analizov težava v obeh stvareh. Izkazalo se je tudi, da bi glede na raz-

lična uporabljena orodja pri planiranju IQC (Westgard sigma rules, OPSpecs chart) postavili drugačna pravila, jih pogosteje izvajali in v več ponovitvah. Če to apliciramo v našo prakso, je nekako nepredstavljivo, saj na istem analizatorju opravljamo 25 merjencev.

Tabela 3. Planiranje IQC glede na rezultat sigm pri uporabi dveh različnih orodij in izračun QGI indeksa.

MEJENEC	TEa [%]	CV [%]	BIAS [%]	SIGMA	QGI	Težava	Westgard Sigma Rules	OPSpecs chart	Pfr	Run Size
Glukoza	10	2,49	2,90	<3,00	0,8	nenatančnost & netočnost	13s/22s/R4/41s/8x N=3, R=2	N=4, R=1 or limit 2SD N=2	0,03 or 0,18	/
Natrij	5	1,01	1,43	3,53	0,9	nenatančnost & netočnost	13s/22s/R4/41s/8x N=4, R=2	12s N=4, R=1	0,18	45
Urat	10	1,43	1,69	5,81	0,8	nenatančnost & netočnost	13s/22s/R4 N=2, R=1	13,5s; N=2, R=1	0,00	450
Kreatinin	10	1,53	2,75	4,74	1,2	nenatančnost & netočnost	13s/22s/R4/41s N=2, R=2	13s/22s/ R4 N=2, R=1	0,01	200
Proteini	10	1,40	0,93	6,51	/	/	13s N=2, R=1	13,5s N=2, R=1	0,00	1000
Alkalna fosfataza	20	3,07	1,66	5,98	0,4	nenatančnost	13s/22s/R4 N=2, R=1	13,5s N=2, R=1	0,00	1000

Dejstvo je, da je teorijo včasih težko prenesti v prakso. Vsekakor pa moramo, ne glede na vse, vzpostaviti sistem, ki bo v skladu z našimi zmoglostmi in hkrati temelječ na teoriji odkril tiste ključne, klinično pomembne napake.

Praktične smernice danes navajajo uporabo neodvisnega kontrolnega materiala, določitev lastnih mej ter izbor ustreznih postopkov izvajanja in vodenja IQC, ki naj bodo načrtovani za vsak analit posebej, na osnovi Sigma metrike. Predvsem slednje zna, kot smo videli, včasih predstavljati težavo.

Vsekakor moramo poiskati tisto pravo pot, ki bo vodila do odkritja pomembnih težav, ne pa tudi tistih manj pomembnih, ki vodijo v lažne zavrtnitve in s kliničnega vidika nimajo pomena.

Za to pa je pomembno sistem poznati, ga spremljati, meriti in računati. Če tega ne delamo, ne moremo vedeti, in če ne vemo, sistema ne moremo nadzorovati in izboljševati. Ključno pri vsem pa je zavedanje, da pred nami ni le vzorec, je vzorec pacienta!

LITERATURA

1. Uradni list RS. Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine (Uradni list RS, št. 64/04, 1/16 in 56/19). Dosegljivo na: <http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=PRAV5602>. Dostop: 18. 9. 2019.
2. CLSI. Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions; Approved Guideline - Third Edition. CLSI document C24-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
3. SIST EN ISO 15189:2013/AC101:2015. Medicinski laboratoriji - Zahteve za kakovost in kompetentnost (ISO 15189:2012) - Popravek AC101.
4. Westgard J.O. Training in Statistical Quality Control for Medical Laboratories. Basic QC practises. Third edition, 2010. Dosegljivo na: <https://www.westgard.com/downloads/free-book-preview-chapters-downloads/56-basic-qc-practices-3rd-edition/file.html>. Dostop: 18.9. 2019.

Uporaba lastnih ciljnih vrednosti pri notranji kontroli kakovosti

Aleš Jerin¹, Flávia Martinello², Milan Skitek¹

¹ Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Ljubljana, Slovenija

² Federal University of Santa Catarina, Department of Clinical Analysis, Florianópolis, Brazil.

Pri zagotavljanju kakovosti v medicinskih laboratorijih je med najpomembnejšimi nalogami redno izvajanje notranje kontrole kakovosti, kar omogoča obvladovanje analitske variabilnosti in drugih pomembnih vplivov na rezultate preiskav. Med materiali za izvajanje notranje kontrole kakovosti se največkrat uporabljajo komercialno dostopni kontrolni materiali z znano vrednostjo analita, redkeje z neznano vrednostjo. Kontrolni materiali, pridobljeni v laboratoriju (npr. iz vzorcev bolnikov), so manj priljubljeni in so v uporabi le za redke preiskave, pri katerih drugačnih možnosti ni na razpolago. Uporabljane meje za sprejemljivost rezultatov notranje kontrole v medicinskih laboratorijih so večinoma $\pm 2SD$ ali $\pm 3SD$, manj običajna pa je uporaba ostalih Westgardovih in drugih pravil kot dodatnih meril za sprejemljivost rezultatov ali kot opozorilnih meril. Za ustrezno izbiro mej za dopustna odstopanja rezultatov notranje kontrole je priporočljivo, da laboratorij za preiskave, ki jih izvaja, postavi analitske cilje. Ti lahko temeljijo na kliničnem pomenu rezultatov, kar je le za redke preiskave jasno opredeljeno, zato je bolj pogosto kot najbolj primerna osnova uporabljena biološka variabilnost. Tretja možnost so analitske zmožnosti metode, ki je na razpolago za uporabo v medicinskih laboratorijih.

Za komercialne kontrolne materiale z znano vrednostjo analita proizvajalci navedejo podatke o dopustnih odstopanjih rezultatov oz. SD, za katere se le redko vprašamo, na kakšen način so pridobljeni. Naša raziskava je pokazala, da so SD za takšne kontrolne materiale izračunane na osnovi koeficientov variacije, ki niso izmerjeni za vsako proizvodno serijo in so določeni arbitrarno, ne glede na koncentracijsko območje. Podatki tudi niso povezani z biološko variabilnostjo posameznih analitov ali z analitskimi značilnostmi metod. Ob uporabi komercialnih kontrolnih materialov, pri katerih proizvajalec navaja srednje vrednosti analitov in tudi SD oz. dovoljena območja odstopanja rezultatov, je zato treba upoštevati, da naj bi bile navedene vrednosti za laboratorij le okvirno vodilo. Clinical and Laboratory Standards Institute priporoča določitev

lastnih srednjih vrednosti in SD ob uporabi vsake nove serije kontrolnega materiala, za kar je potrebnih vsaj 20 meritev. Pri stabilnih razmerah izvajanja meritev je možno uporabiti SD, ki so pridobljene iz predhodnih meritev, če so srednje vrednosti materiala podobne. Naše izkušnje kažejo, da so SD po 20 meritvah zelo majhne in se z daljšim časom uporabe kontrolnega materiala večajo. Dolgoročne vrednosti so bolj realne, saj vključujejo več vplivov, ki se občasno pojavljajo pri vsakdanjem izvajanju preiskav, npr. dodatne kalibracije, menjave pakiranj ali celo serij reagentov, posege na analizatorjih, ipd. Še vedno pa so v laboratoriju pridobljene SD nižje od proizvajalčevih (3). Uporaba SD, ki so pridobljene iz medlaboratorijskih primerjav rezultatov kontrolnega materiala, ni primerna, saj te kljub uporabi enake analitske metode vključujejo medlaboratorijsko variabilnost, ta pa je lahko precej večja od variabilnosti znotraj laboratorija.

V primeru, ko laboratorij za določitev mej za dopustna odstopanja uporablja koeficiente variacije oz. SD, pridobljene iz lastnih meritev kontrolnih materialov, je treba te podatke periodično preverjati in začetne meje popraviti, ko se zbere večje število meritev. Praksa v medicinskih laboratorijih je mnogokrat drugačna, večina laboratorijev dopustnih mej za odstopanja ne spreminja.

Srednjo vrednost pri kontrolnih materialih proizvajalci za vsako proizvodno serijo izmerijo na analitskih sistemih, za katere je kontrolni material predviden. Pogoji, v katerih so izvedene meritve, se razlikujejo od pogojev v laboratoriju, zato je treba srednjo vrednost preveriti in jo po potrebi spremeniti, kar pa je težavno pri redkih preiskavah ali pri kratkih uporabnostih posamezne serije kontrolnega materiala, pri katerih lahko zbiranje 20 zaporednih rezultatov traja predolgo. Deklarirana srednja vrednost kontrol se v glavnem le malo razlikuje od srednje vrednosti, pridobljene v laboratoriju, a morebitna značilnost razlik je lahko razvidna šele po statistični primerjavi.

ZAKLJUČEK

Za meje dopustnega odstopanja rezultatov notranje kontrole je priporočljivo, da so izbrane skladno z analitskimi cilji laboratorija. Medtem ko se srednja vrednost kontrolnega materiala, ki jo navaja proizvajalec, po izkušnjah iz naše primerjave le malo razlikuje od srednje vrednosti, ki jo izmerimo v laboratoriju, pa so deklarirane meje dopustne-

ga odstopanja arbitrarno določene in so lahko precej široke. Zato so za laboratorij le okvirno vodilo, smiselno je, da laboratorij pred njihovo uporabo preveri, ali ustrezajo namenu oz. določi lastna merila za meje. Pri določanju meril se je treba zavedati, da ožje meje ne pomenijo nujno večjih koristi za bolnike.

LITERATURA

1. Westgard JO. Internal quality control: planning and implementation strategies. *Ann Clin Biochem.* 2003;40:593–611.
2. Sandberg S, Fraser CG, Horvath AR, Jansen R, Jones G, Oosterhuis W, et al. Defining analytical performance specifications: consensus statement from the 1st strategic conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(6):833–5.
3. Martinello F, Skitek M, Jerin A. Verifying and assigning own target values and ranges for internal quality control. *Accred Qual Assur.* 2019;24(4):305–12.
4. Laboratory Standards Institute (CLSI). Statistical quality control for quantitative measurement procedures: principles and definitions; approved guideline—third edition. CLSI document C24-A3. Wayne, Pennsylvania USA; 2006.
5. Punyalack W, Graham P, Badrick T. Finding best practice in internal quality control procedures using external quality assurance performance. *Clin Chem Lab Med.* 2018;56(9):226–8. Clinical and
6. Alvarez-Prieto M, Jiménez-Chacón J. A fitness for purpose approach to validation and verification of analytical measurements. *Accred Qual Assur.* 2018;23:219–29.

Quality control and analytical performance specifications for POCT

Sverre Sandberg

Norwegian Quality Improvement of Laboratory Examinations (Noklus), Bergen, Norway

POCT is the most rapidly growing field in laboratory medicine. With increasing technological and analytical possibilities, an increasing number of analyses can now be carried out on POC instruments. Although the costs of POC instruments are less than hospital instruments, the number of users of POC instruments are much larger, ranging from wards in the hospitals, GP offices, nursing homes, pharmacies and last but not least tests for self-measurements. With the increasing emphasis on patient empowerment, this is a wanted development.

The ultimate goal of using POC testing is that patient outcomes should be improved and/or that it should be more cost/effective than the use of conventional laboratory testing. To achieve this, the role of POCT in the different clinical settings as well as the responsibility for introducing and manage the instruments and use of the instruments should be clearly defined. The main reason for using a POC instrument is that a rapid result is more useful than waiting for a result from a central laboratory. An essential question is therefore: Should performance specifications for POC instruments be different from that of instruments in a central laboratory. Many will say “yes”, but taking into account

the different use of such instruments, performance specifications could probably be modified. Many POC instruments are used for specific clinical settings and one should therefore try to develop performance specifications for that setting, i.e. based on clinical outcomes. It is also probable that time and location is an important quality factor and that performance specifications can be less strict if a result is provided rapidly – especially in cases where you would like to know if the result is “very high” or “very low”; e.g. hypo- and hyperglycemia. However, if performance specifications for some POC measurement procedures should be less stringent compared to the central laboratory, it is important that this is communicated to the users of tests.

Quality control is a well-established routine in laboratory medicine. Since POCT is carried out in a different environment with different users and often with different performance specifications and different types of inbuilt controls, we have to re-evaluate how and which types of quality control we should use. Little evidence is available for example for how often to use internal and external quality control for POC instruments.

Pomen notranje in zunanje kontrole kakovosti pri metodah masne spektrometrije in metodah molekularne genetike

Barbka Repič Lampret, Maruša Debeljak

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

Genetske bolezni so obsežna, heterogena skupina bolezni. Ravno zaradi te heterogenosti za prepoznavo posamezne motnje uporabljamo presejalne metode, med katerimi je tandemska masna spektrometrija med najbolj učinkovitimi, predvsem pri prepoznavi vrojenih bolezni presnove. Pri presnovnih boleznih običajno diagnozo dokončno potrdimo z genetsko diagnostiko. Genetske informacije so pomembne tudi za svetovanje družini, odločitve glede zdravljenja, včasih pa lahko tudi predvidimo napredovanje bolezni.

Omenjena diagnostika ima nekaj posebnosti. Vzorce bolnika pogosto analiziramo samo enkrat, in če je rezultat negativen, analiz ne ponavljamo. Glede na to, da so to genetske bolezni, rezultati analiz vplivajo na življenje vseh družinskih članov. Pri iskanju diagnoze iščemo različne diagnostično pomembne presnovke v kompleksnih matriksih, in to z enim analitskim postopkom, ki ne more biti enako optimiziran

za vse analite. Metode so pogosto kvalitativne, zaradi česar je interpretacija rezultatov subjektivna in zahteva izkušeno osebje. Poleg tega so bolezni, ki jih želimo prepoznati, redke in imajo pogosto neznailne klinične slike. Omejeni smo s količino vzorca, ki se jo lahko odvzame novorojenčku ali dojenčku. Po umiritvi presnovne krize tudi ni več zagotovila, da bodo diagnostično pomembni presnovki še povišani. Analize je po navadi treba narediti hitro. Tehnike in oprema, ki jih uporabljamo, pa so tehnološko zahtevne. Bolniki z določeno boleznijo so v posamezni državi redki, ravno tako ni veliko centrov, ki se ukvarjajo z diagnostiko teh bolezni, zato je pomemben del omenjene diagnostike zagotavljanje ustrezne notranje in zunanje kontrole kakovosti. Obstajajo številna priporočila, kot so CLSI-C62A, NBS01-A6, OECD Guidelines for Quality Assurance in Molecular Genetic Testing, vendar pa je vedno treba postopke preveriti in prilagoditi glede na konkretno analizo in zahteve laboratorija.

ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI PRI METODAH MASNE SPEKTROMETRIJE

Vzroke variabilnosti pri metodah tandemske masne spektrometrije (LC-MSMS) lahko razdelimo glede na faze analize:

- priprava vzorca, to so razne metode ekstrakcije, obarjanje proteinov, derivatizacija, ...
- tekočinska kromatografija, ki doprinese največji delež variabilnosti,
- masna spektrometrija,

- pregled kromatogramov in analiza rezultatov.

Za samo interpretacijo rezultatov je pomembno, da imamo podatke o prehranskem stanju bolnika, katera zdravi-la jemlje, opis klinične slike in ostalih rezultatov biokemičnih analiz. Ti podatki morajo biti označeni na spremnem listu, ki ga dobimo z vzorcem.

Pri analizi aminokislin v fizioloških vzorcih merimo v enem analiznem postopku 42 analitov, medtem ko iz posušenega madeža krvi merimo istočasno 57 analitov (acilkarnitinov, aminokislin, sukcinilaceton).

Sistem notranje kontrole kakovosti prepoznave vrojenih bolezni presnove z LC-MSMS sistemom zajema naslednje osnovne postopke:

1. Ocena kvalitete vzorca – posušenega madeža krvi. Študije so dokazale, da lahko zaradi slabega oziroma nepravilnega odvzema dobimo tudi do 44 % napačnih rezultatov (največkrat znižane vrednosti), kar pomeni, da bolezni ne bomo prepoznali. Ti odvzemi so problematični predvsem pri presejalnih testih novorojenčkov, saj bolezen potrjujemo še pred izbruhom klinične slike in so pogosto patološke vrednosti le nekoliko višje od izključitvenih vrednosti.
2. Sledljivost vzorca je zelo pomembna pri presejalnih testih novorojencev. Preiskava se opravlja v dveh laboratorijih, na kliniki za nuklearno medicino in na pediatrični kliniki. Vzpostavili smo sistem, da se posebna filtrirna kartica, na katero vzamemo vzorec krvi novorojenca, označi že ob odvzemu z identifikacijsko črtno kodo. S to kodo se sprejme vzorec v obeh laboratorijih v laboratorijski informacijski sistem. Rezultati vseh analiz se združijo v enoten izvid, ki se po odobritvi prenese nazaj v bolnišnični informacijski sistem.
3. Isto črtno kodo uporabimo tudi pri kreiranju delovne liste, ki jo prenesemo v analizator in tako minimiziramo možnost zamenjave vzorcev med samo pripravo na mikrotitrskih ploščah.
4. Test ustreznosti delovanja sistema in kontaminacije, kar naredimo pred analizo vzorcev.
5. Kontaminacijo preverimo s slepimi vzorci, ustreznost delovanja sistema preverimo z analizo mešanice vseh merjenih analitov. Odziv vsakega analita mora preseči predpisano minimalno intenziteto, ravno tako preverimo retenzijske čase vseh analitov.
6. Uporaba izotopsko označenih internih standardov omogoča kvantifikacijo rezultatov ter zmanjša vpliv matriksa, kar pri metodah masne spektrometrije pogosto predstavlja problem.
7. Pregled kromatogramov: ocenimo obliko posameznih vrhov, preverimo retenzijske čase, razmerje med odzivom signala in šuma, ...

Sistem notranje kontrole kakovosti je pri preiskavah prepoznave vrojenih bolezni presnove z LC-MSMS sistemom pomemben tudi v poanalizni fazi in zajema naslednje osnovne postopke:

1. rezultate in končni izvid pregledata dva analitika in ga tudi avtorizirata;
2. pri avtorizaciji končnega izvida sodeluje tudi pediater endokrinolog, ki poda v primeru pozitivnega izvida nadaljnja navodila glede zdravljenja in vodenja otroka;
3. sheme zunanje kontrole kakovosti vsebujejo tako analizne postopke, kot tudi poanalizno interpretacijo podatkov;
4. laboratorij ima za enega od kazalnikov kakovosti tudi število zavrženih vzorcev posušenega madeža krvi, saj upamo, da se bo to število z rednim izobraževanjem naročnikov znižalo.

Notranje kontrole, ki jih uporabljamo v vsaki seriji meritev so naslednje:

1. Pri analizi aminokislin dodamo med postopkom priprave vzorcev v vsak vzorec (v dveh različnih stopnjah) dve nefiziološki aminokislini, norleucin in norvalin. S tem preverimo učinkovitost postopka. Na začetku in koncu serije vzorcev izmerimo certificiran kontrolni material, ki je od drugega proizvajalca kot reagenčni komplet.
2. Ob menjavi lota internega standarda uporabimo kontrolni material drugega proizvajalca, kot ga uporabljamo za dnevne notranje kontrole.
3. Pri merjenju acilkarnitinov in aminokislin iz posušenega madeža krvi na vsaki mikrotitrski plošči merimo kontrole z nizkimi in visokimi vrednostmi (so del reagenčnega kompleta). Vrednosti spremljamo na kontrolni karti v LIS.

Sodelovanje v shemah zunanje kontrole kakovosti nam omogoča preverjanje metod na različnih ravneh:

1. CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) kontrole so namenjene presejalnim testom novorojencev iz posušenega madeža krvi. Štirikrat letno dobimo pet vzorcev, rezultate podamo kvantitativno in glede na naše izključitvene vrednosti opredelimo, ali so vrednosti znotraj normalnega območja ali patološke.

2. ERNDIM (European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism):

- a. kvantitativna shema za izbrane analite iz posušenega madeža krvi,
- b. kvantitativna shema za aminokisline iz plazme;
 - pri obeh kvantitativnih shemah oddamo rezultate osemkrat letno, na koncu leta dobimo povzetek za posamezne analite glede na točnost, natančnost, linearnost, recovery in medlaboratorijsko primerjavo;

c. kvalitativna analiza acilkarnitinov iz posušenega madeža krvi: dvakrat letno trije vzorci, za katere dobimo podatke o klinični sliki. Podamo rezultate za povišane presnovke, diagnozo, diferencialno diagnozo, če je treba, ter nasvet glede nadaljnje potrditvene diagnostike in ukrepanja glede bolnika (zdravljenje, vodenje).

ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI V MOLEKULARNO-GENETSKEM LABORATORIJU

V kliničnem genetskem laboratoriju z molekularno-genetskimi metodami ugotavljamo specifične spremembe na molekuli DNA ali RNA, ki so vzrok za razvoj klinične slike pri preiskovancih. V zadnjih 20 letih je močno naraslo število genov, ki jih analiziramo pri preiskovancih, hkrati pa tudi število napotitev na genetske preiskave. Izdani molekularno genetski izvidi imajo vpliv na zdravljenje preiskovancev in tudi na njihove reproduktivne odločitve.

Cilji laboratorija, ki se ukvarja z molekularno genetsko diagnostiko, so podobni ciljem ostalih laboratorijev, to je najvišja mogoča kakovost storitve. Tudi sistem zagotavljanja kakovosti je podoben sistemu v ostalih diagnostičnih laboratorijih. Edina pomembna razlika je, da je večina rezultatov preiskav v molekularni genetiki kvalitativnih, zato klasično spremljanje kakovosti ni mogoče. Ključni za zagotavljanje kakovosti rezultatov molekularno-genetskega laboratorija so pravilna organizacija laboratorija, primerne oprema, usposobljenost kadra in seveda učinkovit sistem kontrole kakovosti. Vzpostaviti je treba ustrezen nadzor kakovosti v vseh fazah testiranja, postopki morajo biti validirani, tako analitsko kot klinično, vzpostaviti je treba ustrezno dokumentacijo in poskrbeti za sledljivost na vsaki stopnji obravnave vzorca od prihoda v laboratorij do izdaje izvida. V predanalizni fazi je pomemben nadzor nad transportom, naročilom testa in predvsem je pomembno soglasje preiskovanca o privolitvi v preiskavo. Nad temi postopki ima laboratorij manj vpliva, kot bi bilo zaželeno.

Pomen učinkovite organizacije dela v molekularno-diagnostičnem laboratoriju je posebno velik zaradi velike možnosti kontaminacije in s tem napačnih rezultatov. Prostorska razporeditev dela je izrednega pomena pri preprečevanju kontaminacije. Izolacija DNA mora potekati ločeno od izolacije RNA, razen če je zagotovljena učinkovita eliminacija RNaz. Zaradi zmanjšanja možnosti kontaminacije vzorcev morajo ločeno potekati tudi priprava PCR reakcije, samo pomnoževanje na PCR aparatu, detekcija in metode, ki pomnoževanju sledijo. Pomembna je tudi sterilizacija delovnih raztopin, materiala, površin, menjava rokavic in obleke.

Sistem notranje kontrole kakovosti v analizni fazi molekularno-genetskih preiskav zajema naslednje osnovne postopke:

1. Kontrola izolacije DNA: kakovost in količino izoliranega vzorca DNA preverjamo spektrofotometrično.
2. Uporaba slepe kontrole pri vsaki PCR reakciji z namenom kontrole kontaminacije in uporaba pozitivnih in negativnih kontrol.
3. Ob uvajanju genetskih preiskav vedno analiziramo tudi vzorce bolnikov z znanimi kliničnimi značilnostmi in znanimi rezultati analiz. Ti vzorci imajo lahko patološke rezultate (pozitivne kontrole) ali pa nepatološke (negativne kontrole). Pozitivno kontrolo z znano mutacijo uporabljamo, kadar je ta na voljo, in če je to potrebno za pravilno interpretacijo rezultatov.

4. Potrditev patoloških rezultatov: če opredelimo vzročno genetsko spremembo, rezultat potrdimo s ponovno analizo sveže redčenega vzorca DNA in v določenih primerih z alternativno metodo. Vzročne spremembe, ki v literaturi niso opisane, preverimo v zdravi slovenski populaciji. Pogosto preverimo segregacijo v družini.

Sistem notranje kontrole kakovosti je pri molekularno-genetskih preiskavah pomemben tudi v poanalizni fazi in zajema naslednje postopke:

1. rezultate in končni izvid pregledata dva analitika in ga tudi avtorizirata;
2. pri avtorizaciji končnega izvida sodeluje tudi klinični genetik;
3. sheme zunanje kontrole kakovosti vsebujejo tako analizne postopke, kot tudi poanalizno interpretacijo podatkov;
4. laboratorij ima za enega od kazalnikov kakovosti tudi število popravkov molekularno-genetskih izvidov.

Kontrolni material za molekularno-genetske preiskave je pogosto težko dobiti, nekatere kontrole so dosegljive komercialno, druge pa pripravimo v laboratoriju.

Nujno je seveda tudi sodelovati v shemah zunanje kontrole kakovosti, ki omogočajo preverjanje učinkovitosti zaznavanja znane mutacije, neznane mutacije ali izvajanja določenega metodološkega postopka. Uporabljamo sheme kontrole kakovosti za specifične bolezni ali klinična stanja, kot so: Crohnova bolezen, celiakija, laktozna intoleranca, cistična fibroza (INSTAND), cistična fibroza z interpretacijo rezultatov (CF-network) in hiperholesterolemija (GenQA). Shema zunanje kontrole kakovosti za sekvenciranje (RfB) zajema celoten analizni postopek sekvenciranja neznane DNA vzorca, podajanje rezultatov in interpretacijo genetskega rezultata. Za kontrolo sekvenciranja naslednje generacije (NGS) uporabljamo shemo GenQA, pri kateri preverjamo izvedbo NGS sekvenciranja, detekcijo delecij, duplikacij in strukturnih sprememb ter sekvenciranje mitohondrijskega genoma.

Za uspešno delo molekularno-genetskega laboratorija je nujno kontinuirano izobraževanje vseh profilov laboratorijskega osebja.



NO ONE SAW IT COMING
**IDENTIFY.
PREDICT.
ACT.**

PHYSICIAN RESOURCE

Risk Stratification of the Apparently Healthy
Population for Future Cardiac Events

HeartAsure⁺

Join the HeartAsure movement by adding Abbott's High Sensitive Troponin-I cardiac specific blood test to your patient's health check. And help change lives.

CHOOSE TRANSFORMATION™



Clinical Diagnostics

Autoimmune • Serology • BioPlex[®] 2200 Multiplex Testing • Diabetes Testing • Hemoglobinopathies
Bacteriology / Mycology • Newborn Screening • Quality Control • Special Chemistry
Critical Raw Materials • Remote Monitoring & Support • Access Virology and Antibodies • Immunohematology



Distributer za Slovenijo:

 **diahem**

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



INDIKO PLUS **biokemični analizator**

Popolnoma avtomatiziran analizator za določanje biokemičnih testov kot tudi merjenje koncentracij zdravilnih učinkovin in določanje prepovedanih snovi v bioloških vzorcih. Je enostaven za uporabo ter zelo fleksibilen sistem z majhno porabo reagentov in vode.

MYTHIC 22 AL **hematološki analizator**

Analizator omogoča določitev osnovne krvne slike in 5-DIFF krvne slike, skupaj 24 parametrov. Za svoje delo potrebuje samo tri reagente. Ima dve možnosti vzorčenja: avtoloader in odprti način za pediatrične vzorce. Volumen vzorca je samo 18,2 µl.



LABUMAT & URISED 3 PRO **urinska analizatorja**

Analizni sistem omogoča kemijsko analizo urina in urinskega sedimenta s pomočjo svetlobnega in fazno kontrastnega mikroskopa. Sistem za svoje delo ne potrebuje posebnih reagentov in kalibratorjev. Volumen vzorca za obe analizi je manj kot 3 ml.



Interexport

Interexport d. o. o.

Potok pri Komendi 12

SI-1218 Komenda

T: 01/ 834 44 00

E: medicina@interexport.si

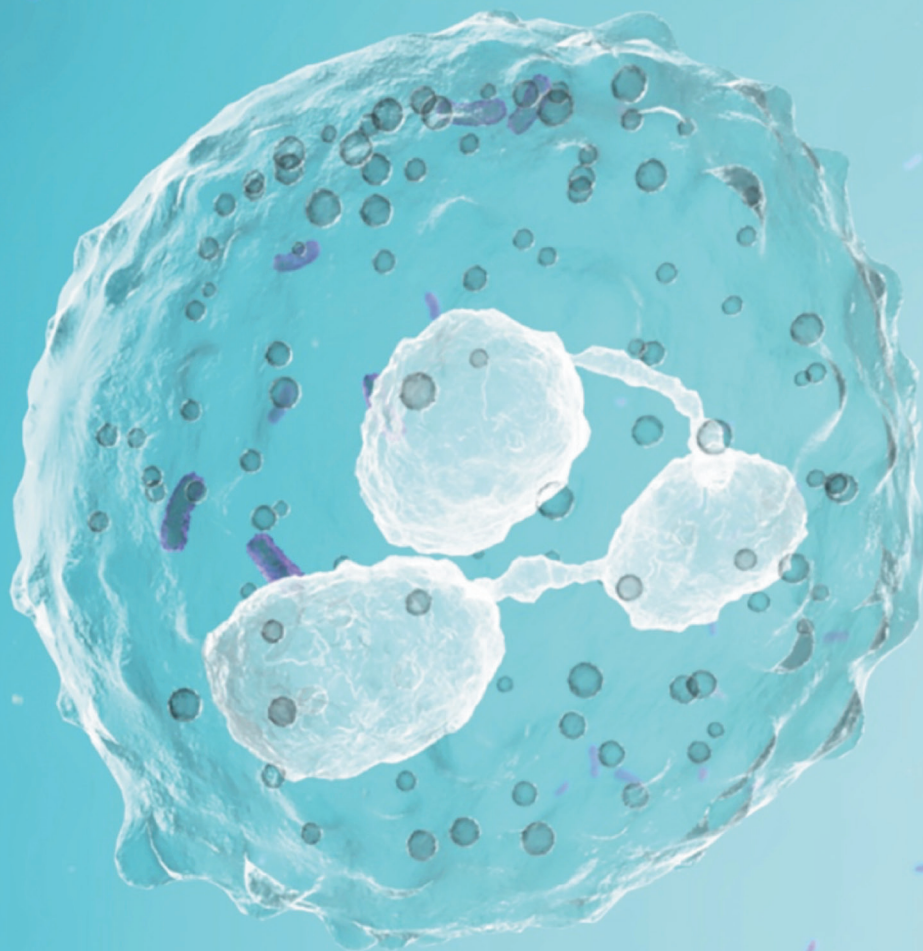
www.interexport.si



Vaš partner kakovosti in zaupanja

- Smo zanesljiv zastopnik in distributer materiala za potrebe laboratorijske diagnostike.
- Naši poslovni partnerji nas cenijo in nam zaupajo, ker svoje delo opravljamo profesionalno in v skladu z najstrožjimi standardi.
- Odlikujejo nas izredno hitra odzivnost, fleksibilnost, natančnost in ažurnost.
- Imamo sodobno skladišče z vrhunsko opremo, da lahko našim poslovnim partnerjem vedno zagotovimo najboljšo storitev.
- Interexport je edini pooblaščen distributer priznanega dobavitelja Siemens Healthineers za področje Slovenije.

Celovite
laboratorijske
rešitve po
vaši meri.

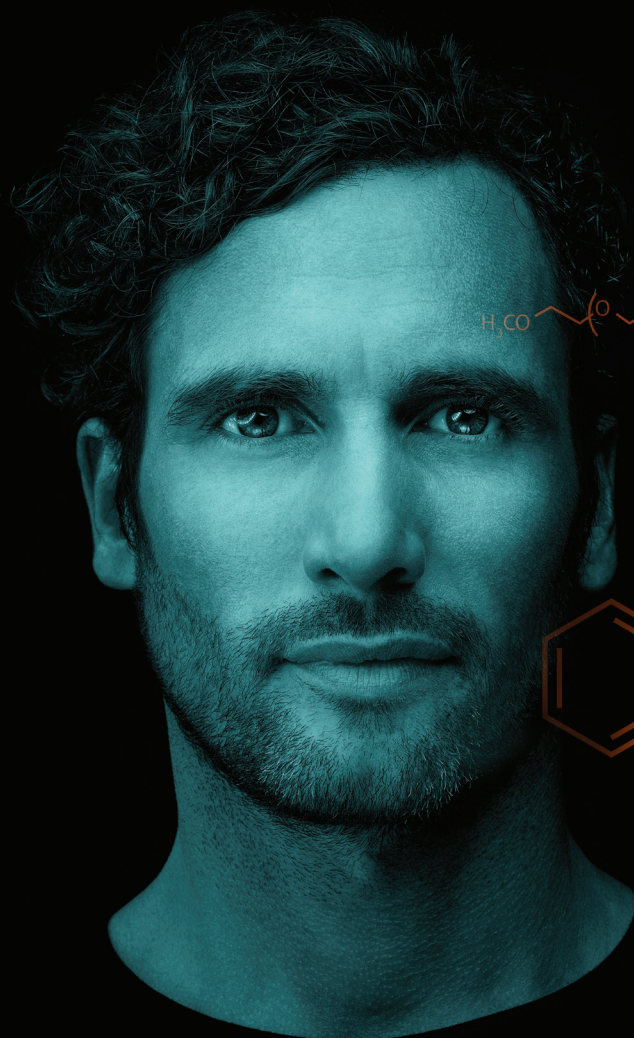


- ❖ Sysmex ❖ CellaVision ❖ Arkray
- ❖ Ortho Clinical Diagnostics
- ❖ Snibe ❖ Mechatronics (ESR)
- ❖ RAL Diagnostics ❖ DRG
- ❖ Eurolyser ❖ Techno Medica

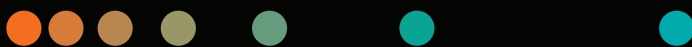
Računajte na Enhanced Liver Fibrosis (ELF™) Test

Ocenite tveganje za napredovanje nealkoholne maščobne spremenjenosti jeter (NAFLD), nealkoholnega steatohepatitisa (NASH) in drugih bolezni jeter s preprostim krvnim testom.

siemens-healthineers.si/elf



ELF test ni na voljo v ZDA. Razpoložljivost produkta se lahko od države do države spreminja in je podvržen različnim regulatornim zahtevam. ELF je blagovna znamka Siemens Healthcare Diagnostics Inc.
©Siemens Healthcare Diagnostics Inc., 2019



ISSN 2670-4463



9 772670 446006

www.szkkim.si