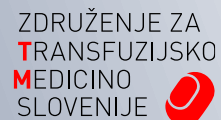


Združenje hematologov Slovenije (ZHS)



Združenje za transfuzijsko medicino Slovenije (ZTMS)



Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v hematologiji (SMSZT)

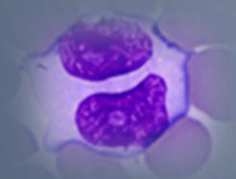


Hematološko laboratorijsko združenje (HLZ)



# Zbornik povzetkov april 2023

Podčetrtek 14 – 15. April 2023



Strokovno srečanje Združenja hematologov Slovenije, Združenja za transfuzijsko  
medicino Slovenije, Sekcije medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v hematologiji in  
Hematološkega laboratorijskega združenja

# Zbornik povzetkov april 2023

Podčetrtek, 14.-15. april 2023



**Strokovno srečanje Združenja hematologov Slovenije, Združenja za transfuzijsko medicino Slovenije, Sekcije medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v hematologiji in Hematološkega laboratorijskega združenja.**

**Zbornik povzetkov april 2023**

**Strokovni recenzenti:** Irena Preložnik Zupan, Matevž Škerget, Barbara Skopec, Helena Podgornik, Tadej Furlan, Katarina Reberšek, Boštjan Jovan, Alenka Dobrovoljc, Primož Požnel, Polonca Mali, Ivica Marić, Primož Rožman

**Uredili:** Matevž Škerget, Boštjan Jovan, Primož Požnel, Hermina Čibej

**Založilo:** Združenje hematologov Slovenije

**Za založbo:** Matevž Škerget

**Spletna stran:** [www.zhs.si](http://www.zhs.si)

Ljubljana 2023

CIP- Kataloški zapis o publikaciji

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

[COBISS.SI](http://COBISS.SI)-ID [147194115](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:si:zbs-147194115)

ISBN 978-961-95890-2-1 (PDF)

## **Avtorji prispevkov**

Ajda Mihorič	Julij Šelb	Nadan Gregorič
Aleksandra Bajt	Karla Renner	Nataša Fikfak
Alenka Trampuš Bakija	Karla Renner	Nejc Pulko
Aleš Ladiha	Katarina Reberšek	Neva Kavčič
Ana Bošković	Katja Berk Lahajner	Olga Točkova
Ana Čebokli	Katja Petruša	Peter Kopač
Ana Doplihar Kebe	Klara Šlajpah	Peter Korošec
Ana Marija Kovačič Tonejc	Luka Čemažar	Peter Vičič
Ana Milojković	Maja Grahek	Polona Novak
Apolonija Uran	Manca Svetina	Polonca Mali
Barbara Skopec	Marjeta Maček Kvanta	Primož Požnenel
Biljana Todorova	Mateja Pipuš	Primož Rožman
Damijan Slakan	Matevž Škerget	Samo Zver
Dražen Fanič	Matija Rijavec	Sandra Šučurovič
Enver Melkić	Matija Rozman	Sanja Sobočan Koša
Erik Rupnik	Matjaž Sever	Sara Kos
Erika Hrastar	Miodrag Janić	Saša Anžej Doma
Gaja Cvejič Vidali	Mihela Šajn	Sergeja Gregorič
Helena Podgornik	Milenka Poljanec Bohnec	Tajda Starman
Irena Bricl	Mitja Košnik	Tanja Hartman
Irena Preložnik Zupan	Mojca Dreisinger	Tanja Štraus
Ivica Marić	Mojca Huber	Urška Dolinar
Jani Lovšin	Mojca Toplišek	

## Vsebina

NOVOSTI V UGOTAVLJANJU IN RAZVRŠČANJU KRVNIH BOLEZNI (ZHS IN HLZ).....	1
Stopenjska diagnostika mielodisplastičnega sindroma .....	1
Stopenjska diagnostika akutne mieloične levkemije .....	5
Diagnostika in sledenje akutne limfoblastne levkemije.....	8
Novosti v klasifikaciji novotvorb limfatičnega tkiva.....	11
ZDRAVLJENJE MDS IN AML PRI STAREJŠIH BOLNIKI MED 65 – 75 LET (ZHS).....	14
Pomen biologije AML na izbiro prvega zdravljenja.....	14
Vpliv bolnikovih značilnosti na izbiro prvega zdravljenja AML .....	19
Kdaj bolnika z MDS napotiti na PKMC.....	23
Sledenje kardiovaskularne toksičnosti tekom zdravljenja akutne mieloične levkemije.....	26
Izbira starejšega bolnika primerne za alogensko PKMC, integracija bolnikovih in bolezenskih značilnosti .....	31
MIELOPROLIFERATIVNE BOLEZNI (ZHS).....	35
Izbira zdravila pri pravi policitemiji – interferon ali ruksolitinib .....	35
Diagnostika in zdravljenje primarne mielofibroze .....	39
Vodenje primarne mielofibroze - kdaj bolnika napotiti na presaditev krvotvornih matičnih celic .....	45
Trombotični zapleti pri Ph-negativnih mieloproliferativnih novotvorbah.....	50
PREPREČEVANJE ZAPLETOV PRI BOLNIKI S KRVNO BOLEZNIJO (ZHS IN SMSZT).....	54
Novosti v profilaksi in cepljenju po presaditvi krvotvornih matičnih celic .....	54
Nova dognanja o prehrani po presaditvi krvotvornih matičnih celic .....	61
Preprečevanje mukozitisa ob PKMC .....	64
HEMATOLOGIJA IN TRANSFUZIJSKA MEDICINA (ZHS IN ZTMS).....	67
Avtoimunske citopenije, vzrok in diagnostika .....	67
Imunihematološko testiranje pri avtoimunskih hemolitičnih anemijah (DCT+ in DCT-) .....	72
Izguba antigena RhD .....	77
Konzervativni pristop k transfuzijskem zdravljenju .....	81
AVTOMATIZACIJA LABORATORIJSKIH PREISKAV (ZTMS) .....	85

Popolna avtomatizacija predtransfuzijskih preiskav – izkušnje ZTM.....	85
Avtomatizacija imunohematoloških preiskav v laboratoriju za prenatalne preiskave (izkušnje ZTM).....	89
ERITROCITI (HLZ) .....	92
Eritrocitna vrsta in njeno vrednotenje v mikroskopskem pregledu krvnega razmaza .....	92
Bolezni eritrocitne vrste s strani hematologa.....	95
Analiza eritrocitne vrste s pretočno citometrijo.....	100
Motnje delovanja eritrocitnih encimov .....	103
MASTOCITOZA (HLZ) .....	106
Mastocitoza- pogled hematologa .....	106
Mastocitoza - pogled s strani alergologa .....	109
Molekularno genetske preiskave C-KIT.....	113
Genetski vzrok za povišano bazalno triptazo.....	115
Kožna mastocitoza .....	118
HEMATOLOGIJA IN HEMATOLOGIJI SORODNE TEME (SMSZT).....	122
Pomen higiene rok.....	122
Gradnje in zaščita.....	125
Sladkorna bolezen in zdravljenje z glukokortikoidi.....	129
Zdravljenje z inzulinom .....	133
Samovodenje – prilagajanje odmerkov insulina .....	139
Predstavitve dnevnih bolnišnic oddelka za hematologijo in onkologijo Splošne bolnišnice Celje. ....	145
Zdravstvena nega odraslega bolnika, ki prejema blinatumomab.....	150
Zdravstvena nega otroka, ki prejema blinatumomab – predstavitev primerov .....	153
PRIPRAVA, SHRANJEVANJE IN IZDAJA KRVNIH KOMPONENT (SMSZT) .....	158
Pomen dobrega sodelovanja med Zavodom za transfuzijsko medicino in Kliničnim oddelkom za hematologijo na nivoju zdravstvene nege.....	158
Priprava, shranjevanje in izdaja trombocitov .....	164
Obsevanje krvnih pripravkov .....	169
KRVODAJALSTVO IN PRESKRBA S KRVJO (ZTMS) .....	174

Zbiranje plazme s postopkom plazmafereze, merila za izbor krvodajalcev, postopek in kontrola kakovosti .....	174
Nova komponenta krvi: patogensko inaktivirana plazma .....	179
IMUNOHEMATOLOGIJA (ZTMS).....	183
Predstavitev kliničnega primera bolnika z aloprotitelesi anti-Co(b).....	183
Potrjevanje eritrocitnih antigenov v sklopu navzkrižnih preizkusov .....	187
Razreševanje diskrepantnih rezultatov testiranja v sistemu ABO .....	192
Predstavitev kliničnega primera napačne krvne skupine v informacijskem sistemu .....	198
CELIČNE TERAPIJE (ZTMS) .....	201
Delecija limfocitov T alfa/beta (+/-CD19) v presadku krvotvornih matičnih celic.....	201
Pridobivanje JACIE akreditacije na Centru za afereze Oddelka za terapevtske storitve ZTM .	205
Register darovalcev granulocitov.....	209
SISTEM KAKOVOSTI (ZTMS) .....	212
Sistem vodenja kakovosti na Zavodu RS za transfuzijsko medicino .....	212
Neskladnosti na Zavodu RS za transfuzijsko medicino .....	216
Presoje sistema vodenja kakovosti na Zavodu RS za transfuzijsko medicino.....	220



# NOVOSTI V UGOTAVLJANJU IN RAZVRŠČANJU KRVNIH BOLEZNI (ZHS IN HLZ)

## Stopenjska diagnostika mielodisplastičnega sindroma

*Helena Podgornik*

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

*helena.podgornik@kclj.si*

Klasifikacija svetovne zdravstvene organizacije (WHO) je od prve izdaje leta 2001 služila kot mednarodni standard razvrščanja limfohematopoetskih novotvorb (1). V letu 2022 smo se soočili z dvema predlogoma klasifikacij, s končno izoblikovano razvrstitvijo ICC (International Consensus Classification) (2, 3) ter peto izdajo WHO (4,5), ki je zaenkrat dostopna v elektronski obliki in v kateri bo morda še prišlo do dodatnih sprememb. Tako je poleg tega, da so se nadgradila znanja ter klinični, imunofenotipski in genetski podatki glede na 4. izdajo WHO (WHO 2016), potrebno zdaj poznati tudi vsebinske in terminološke razlike med obema klasifikacijama. Do morebitne uskladitve se namreč priporoča navajanje diagnoze po obeh (1).

Začnimo s prvo spremembo, ki je terminološka. Namesto mielodisplastičnih sindromov WHO uvaja izraz mielodisplastične novotvorbe, pri čemer v izogib zamenjav z mieloproliferativnimi novotvorbami ohranja okrajšavo MDS. MDS je bolezen, ki jo opredeljujejo citopenije v venski krvi in displazija v morfologiji, za katero je postavljena prazna vrednost 10% celic posamezne hematopoetske vrste (4). Zato je za razvrstitev MDS nujno potrebna celotna krvna slika z diferencialno krvno sliko ter natančna citomorfološka ocena celic kostnega mozga (KM). To zadošča za morfološko opredelitev podskupin MDS, s katero se v nadaljevanju ne ukvarjam, ker večjih sprememb v razvrstitvah ni. Če smo doslej imeli le eno genetsko definirano podskupino MDS (sindrom 5q-), pa obe klasifikaciji uvajata dva genetska označevalce, različice v genih *SF3B1* in *TP53*, ki opredeljujejo nove podskupine MDS. Delež blastov (v KM oziroma venski krvi) in prisotnost opredeljujočih somatskih različic sta namreč ključna kriterija, ki delno razmejujeta podvrste bolezni na spektru MDS – akutna mieloblastna levkemija (AML) (6). Poleg dvojne klasifikacije je namreč umik jasne meje 20% blastov v KM kot kriterij za postavitve diagnoze AML in uvedba prekrivne skupine AML/MDS dodatni izziv, s katerim se srečujemo pri stopenjski diagnostiki obeh bolezni.

Klasifikacija MDS torej temelji na delitvi med podskupinami z definirajočimi genetskimi preureditvami ter morfološko določenimi podskupinami MDS. Za ustrezno razvrstitev MDS nujno potrebujemo podatek vsaj o prisotnih različicah v genih *TP53* in *SF3B1* ter delež blastov. MDS s *SF3B1* zamenjuje MDS s prstanastimi sideroplasti, ker je somatska mutacija bolj določujoča kot so prstanasti sideroplasti. MDS s *SF3B1* ali del(5q) sta posebni podskupini le pri nizkem deležu blastov (<5% v KM), s tem, da WHO to poudari že v imenu podskupine, ICC pa le v kriterijih (1). Pri različicah v genu *TP53* gre za zahtevnejše razlikovanje (7). ICC klasifikacija opredeljuje MDS z mutiranim *TP53*, WHO pa MDS z bialelno inaktivacijo *TP53*. ICC namreč ločuje med enojno mutiranim *TP53* in t.i. multihit *TP53*, pri čemer upošteva tudi delež blastov ter alelno frekvenco različice (VAF). Pod 10% blastov, je MDS opredeljujoča multihit mutacija *TP53*, pri 10-20% blastov kakršnakoli mutacija v *TP53* z VAF>10% določa t.i. AML/MDS z mutiranim *TP53*, nad 20% blastov pa imamo AML z mutiranim *TP53*. Po WHO klasifikaciji vse bialelne inaktivacije *TP53* opredeljujejo MDS, če je delež blastov nižji od 20%.

Z diagnostičnega vidika je ključno, da razumemo, kako so odločevalci dorekli »multihit« (ICC) oziroma bialelno (WHO) mutacijo *TP53*. Gre namreč za to, katere preiskave nujno potrebujemo, da tako opredeljene spremembe prepoznamo:

- Dve ali več mutacij v *TP53* (Sekvenciranje, sekvenciranje naslednje generacije - NGS).
- Ena mutacija *TP53* z izgubo heterozigotnosti, ki je nevtralna glede na število kopij (Sekvenciranje, NGS; VAF>50%).
- Ena mutacija *TP53* (Sekvenciranje, NGS, FISH, kariotipizacija in/ali CGH) z izgubo heterozigotnosti (delecijo na 17p ali po ICC tudi kompleksen kariotip).

V oklepaju zgoraj so navedene metode, ki so potrebne za prepoznavanje sprememb. Zaenkrat nimamo na voljo ene same in je potrebna njihova kombinacija. Katere preiskave torej nujno potrebujemo kot del diagnostične obravnave bolnika z MDS?

Najprej moramo pričeti pri definiciji MDS, ki ga opredeljuje vztrajna citopenija. Ta mora potrjeno trajati vsaj 4 mesece (2), pri čemer je potrebno izključiti vse druge vzroke zanjo. Za ta prvi korak potrebujemo zgolj krvno sliko. Šele nato pridejo na vrsto zahtevnejše preiskave. Punkcija kostnega mozga s citomorfološko oceno KM je pri MDS neizogibna. Natančna citomorfološka ocena z določitvijo displazij in zlasti deleža blastov ni ključna le diagnostično, tudi pri opredelitvi napovednega pomena je delež blastov parameter z veliko močjo tako pri mednarodnem točkovnem sistemu IPSS-R kot IPSS-M. Ne gre le za oceno deleža blastov nad 5%, pač pa na spodnji meji tudi med 2% in 5%. Z uvajanjem prekrivne entitete MDS/AML smo dobili še drugo zelo

pomembno mejo: 10% blastov. Ker gre za nizke vrednosti, je toliko bolj problematična točnost določitve njihovega deleža.

Ne moremo mimo dejstva, da so bolniki z MDS praviloma starejši in pogosto krhki. Zato je pri odločitvi o genetskih preiskavah ključno vprašanje, ali bo natančna postavitev diagnoze kakorkoli vplivala na obravnavo bolnika. Če se namreč odločimo za celovito diagnostiko, je neizogibno, da izvedemo poleg citogenetskih preiskav tudi NGS, tako zaradi klasifikacije bolezni, zlasti celovite opredelitve statusa *TP53*, kot zaradi prepoznavanja napovedno pomembnih različic v drugih genih. Poleg zahtevnosti same klasifikacije MDS se namreč zdaj soočamo še s prekrivnostjo AML/MDS. Po eni strani se je z novima klasifikacijama močno povečalo število genetskih preureditev, ki določajo AML ne glede na delež blastov, po drugi strani pa prisotnost in vrsta mutacij v *TP53* ključno določa tako podskupine MDS kot AML oziroma AML/MDS. Zato vse govori v prid dejstvu, da je NGS del rutinske obravnave vsakega bolnika s sumom na MDS. S katerimi dvomi se torej srečujemo? S področja citogenetike vemo, da je delež preurejenih kariotipov pri bolnikih, ki so napoteni pod sumom na MDS bistveno manjši od pričakovanih 50%, kar je posledica velikega deleža nepotrjenih napotnih diagnoz, te pa so delno posledica upravičenega izogibanja nepotrebnim ponavljanjem punkcij. Ključno je torej, da se izvede dosledno »presejanje« bolnikov z MDS pred vstopom v diagnostični proces. Obenem pa tudi ne gre pozabiti, da je preiskave potrebno pri bolnikih, kjer bolezen traja dlje, pred kliničnimi odločitvami ponoviti, ker lahko pride do novih sprememb.

## Viri

1. Falini B, Martelli MP. Comparison of the International Consensus and 5th WHO edition classifications of adult myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 2023;98(3):481-492.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* 2022;140(11):1200–1228.
3. Hasserjian RP, Orazi A, Orfao A, Rozman M, Wang SA. The International Consensus Classification of myelodysplastic syndromes and related entities. *Virchows Arch.* 2023;482(1):39-51
4. Houry JD, Solary E, Abal O, et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of Haematolymphoid Tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia.* 2022;36(7): 1703-1719.
5. Zheng G, Li P, Zhang X, Pan Z. The fifth edition of the World Health Organization Classification and the International Consensus Classification of myeloid neoplasms: evolving guidelines in the molecular era with practical implications. *Curr Opin Hematol.* 2023;30(2):53-63.

6. Zavras PD, Sinanidis I, Tsakiroglou P, Karantanos T. Understanding the Continuum between High-Risk Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):5018.
7. Marks JA, Wang X, Fenu EM, Bagg A, Lai C. TP53 in AML and MDS: The new (old) kid on the block. *Blood Rev.* 2023;14:101055.

## Stopenjska diagnostika akutne mieloične levkemije

*Sandra Šučurović*

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

*sandra.sucurovic@kclj.si*

Kopičenje somatskih različic v krvotvorni matični celici (KMC), ki omogoča samoobnovo in razmnoževanje neoplastičnega klona, vodi v razvoj akutne mieloične levkemije (AML). Epigenetsko stanje levkemične celice, mikrookolje kostnega mozga, zdravje normalne KMC in ostale lastnosti levkemije pomembno vplivajo na potek in razvoj bolezni (1). Za določitev AML je ključna imunofenotipizacija, ki s pomočjo fluorescenčno označenih protiteles razporedi celice na osnovi njihove velikosti in notranje strukture ter glede na prisotnost površinskih in znotrajceličnih označevalcev (antigenov). Za dokončno opredelitev diagnoze so potrebne še citogenetske in molekularno genetske preiskave za določitev ponavljajočih se genetskih sprememb.

V letu 2022 so bile izdane nove smernice svetovne zdravstvene organizacije (WHO-world health organization, 5. izdaja) in evropske mreže za levkemijo (ELN – European LeukemiaNet) za diagnostiko in klasifikacijo akutne mieloične levkemije (AML). Smernice se nekoliko razlikujejo v klasifikaciji AML.

### **Ključne spremembe v definiciji in klasifikaciji AML po WHO smernicah**

AML je razporejena v dve veliki skupini: AML opredeljena z genetskimi spremembami in AML opredeljena z diferenciacijo. Podskupina AML, NOS (not otherwise specified; brez določene opredelitve) ni več v uporabi. Za večino AML, opredeljenih z genetskimi spremembami, prisotnost vsaj 20% blastov ni več pogoj za postavitev diagnoze. Izjemi sta AML z *BCR::ABL1* ter *CEBPA*, kjer še vedno velja meja  $\geq 20\%$  blastov.

Podskupina AML s spremembami povezanimi z mielodisplazijo (myelodysplasia-related changes) je preimenovana v AML povezana z mielodisplazijo (AML-MR; myelodysplasia-related). AML-MR je razvrščena v skupino AML opredeljeno z genetskimi spremembami in je definirana kot novotvorba z  $\geq 20\%$  blastov, ki izražajo mieloični imunofenotip s specifičnimi citogenetskimi in molekularno genetskimi spremembami značilnimi za mielodisplastični sindrom (MDS). Ključne spremembe za definicijo AML-MR so: ukinitve morfologije kot edinega kriterija za definicijo AML-MR, nadgradnja citogenetskih kriterijev in uvedba kriterijev, ki temeljijo na prisotnosti različic v

enem od 8 genov: *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR* in *STAG2*. Več kot 95 % različic v teh genih je specifično prisotnih pri AML, ki izhaja iz MDS (2).

### **Ključne spremembe v definiciji in klasifikaciji AML po ELN smernicah**

AML je razporejena v štiri skupine: AML s ponavljajočimi se genetskimi spremembami, AML z mutiranim *TP53*, AML z genetskimi spremembami povezanimi z mielodisplazijo in AML s citogenetskimi spremembami povezanimi z mielodisplazijo.

Pri skupini AML s ponavljajočimi se genetskimi spremembami je prišlo do spremembe v definiciji AML glede na število blastov. Če je v kostnem mozgu ali venski krvi prisotno  $\geq 10\%$  blastov in je prisotna ena od ponavljajočih se genetskih sprememb, gre za AML. Izjema je AML s fuzijskim genom *BCR::ABL1*, kjer mejna vrednost blastov ostaja  $\geq 20\%$ . Prav tako ta meja ostaja za vse ostale skupine AML.

Če ima bolnik 10-19 % blastov in ima določene različice v genih *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* in /ali *ZRSZ2*, spada v novo podskupino - MDS/AML opredeljena z genetskimi spremembami. To so primeri, ki so na meji med MDS in AML glede na biologijo in prognozo bolezni.

Ena večjih sprememb klasifikacije je, da zdaj jasno navaja hierarhijo genetskih sprememb, ki jih določimo z laboratorijskimi analizami. Primarne so AML s ponavljajočimi se genetskimi spremembami, sledijo AML z mutiranim *TP53* (neodvisno od sočasnih genetskih nepravilnosti je napovedno neugodna), nato AML z genskimi spremembami povezanimi z mielodisplazijo, ki so napovedno neugodne in nazadnje AML s citogenetskimi spremembami povezanimi z mielodisplazijo (1).

Obe organizaciji (WHO in ELN) sta pri AML s ponavljajočimi se genetskimi spremembami uvedli novo podskupino, AML z *in frame* bZIP različico v genu *CEBPA*, ki je napovedno ugodna (1,2).

Ena večjih sprememb glede napovednega pomena AML je uvrščanje FLT3 ITD različice, ne glede na prisotnost različic v genu *NPM1*, med napovedno vmesne spremembe (1).

V Specializiranem hematološkem laboratoriju, UKC Ljubljana ob diagnozi AML, ki temelji na citomorfološkem izsledku in imunofenotipizaciji, vedno izvedemo še citogenetske in molekularno genetske preiskave. Citogenetske preiskave obsegajo kariotipizacijo in preiskavo FISH (fluorescenčna *in situ* hibridizacija). S kariotipizacijo ugotavljamo ploidnost ter strukturne spremembe kromosomov. S preiskavo FISH se pri vsaki AML določa prisotnost preureditve genov *MECOM* in *KMT2A*, glede na imunofenotip pa še prisotnost fuzijskih genov *RUNX1::RUNX1T1* ali

*CBFB::MYH11* oziroma *PML::RARA*. Z molekularno genetskimi preiskavami določamo prisotnosti različic ITD in TKI v genu *FLT3* ter prisotnost različic v genu *NPM1*. Te preiskave so izvedene v treh delovnih dneh, ker je od njihove prisotnosti odvisen potek zdravljenja bolezni. V primeru, da citogenetske preiskave pokažejo prisotnost fuzijskih genov *PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1* ali *CEBFB::MYH11* izvedemo še preiskavo za določitev izražanja teh fuzijskih genov. V laboratoriju lahko z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR-polimerase chain reaction) pri AML spremljamo merljivo preostalo bolezen (MRD) za: *NPM1* (prepisi tipa A, B in D), *PML::RARA* (bcr1, bcr2 in bcr3), *CBFB::MYH11* (Tip A, B in E), *RUNX1::RUNX1T1* in *BCR::ABL1* (e13a2, e14a2 in e1a2). Za spremljanje MRD je nujno, da smo iz vzorca ob postavitvi diagnoze določili izhodiščno vrednost. Preiskavo je zaželeno izvajati na isti vrsti vzorca (kostni mozeg, periferna krvi). MRD lahko določamo tudi s pomočjo imunofenotipizacije, če ob postavitvi diagnoze zaznamo fenotip, ki je specifičen za maligne celice.

Po dokončani primarni diagnostiki izvedemo še preiskavo sekvenciranje naslednje generacije (NGS). S to preiskavo analiziramo 37 genov, ki so značilni za mieloične novotvorbe, med temi geni so tudi *SXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* in *ZRSZ2*, ki so po novih smernicah ključni za klasifikacijo in napovedni pomen AML.

## Viri

1. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* 2022;140(12):1345-1377.
2. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022;36(7):1703-1719.

## Diagnostika in sledenje akutne limfoblastne levkemije

Ana Doplihar Kebe

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

ana.kebe@kclj.si

Akutna limfoblastna levkemija spada glede na klasifikacijo svetovne zdravstvene organizacije (WHO-world health organization, 5. izdaja WHO klasifikacije Hematolimfoidnih tumorjev) med limfatične novotvorbe. Nastane kot posledica pridobljene somatske mutacije in nenadzorovane rasti v limfatično vrsto (B ali T) usmerjene multipotentne matične celice. Te ohranijo sposobnost delitve, izgubijo pa sposobnost dozorevanja, kar vodi v kopičenje spremenjenih nezrelih celic (kostni mozeg, kri, različni organi). O levkemiji govorimo, ko v kostnem mozgu najdemo vsaj 25% blastnih celic. Za določitev vrste levkemije (B- ali T-ALL) je ključna imunofenotipizacija, ki razporedi celice na osnovi njihove velikosti in notranje strukture ter glede na prisotnost površinskih in znotrajceličnih označevalcev (antigenov), ki jih zaznamo s pomočjo fluorescenčno označenih protiteles. Ti antigeni so specifični za celično vrsto in stopnjo zrelosti, kar je ključno za postavitev diagnoze. Za dokončno opredelitev diagnoze po WHO pa so potrebne še citogenetske in molekularno genetske preiskave za določitev ponavljajočih se genetskih sprememb.

### B-ALL

Glede na WHO klasifikacijo spada B-celična limfoblastna levkemija (B-ALL) med neoplazme prekursorjskih celic B. Njena klasifikacija temelji na spremembah ploidnosti kariotipa (hiperdiploidnost, hipodiploidnost) kot tudi na kromosomskih spremembah ali prisotnosti drugih genetskih sprememb. V večini primerov so spremembe, ki vodijo v nastanek B-ALL znane: iAMP21 (intrakromosomska amplifikacija kromosoma 21), fuzije genov *BCR::ABL1*, *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1* in *IGH::IL3* ter preureditve gena *KMT2A*. V tej klasifikaciji najdemo 13 podvrst B-ALL (Tabela 1). V kategorijo B-ALL, NOS (not otherwise specified; brez določene opredelitve) uvrstimo primere, ki jih na podlagi izvedenih preiskav ne moremo razvrstiti v nobeno od ostalih kategorij. Nova klasifikacija iz leta 2022 je uvedla tri dodatne genetsko določene podvrste. B-ALL s fuzijo *TCF3::HLF*, ki je redka, a je zanjo značilen agresiven potek bolezni ter B-ALL z *BCR::ABL1* oziroma *ETV6::RUNX1* podobnimi lastnostmi. Študije ekspresije genov in sekvenciranje nove generacije (NGS) omogočata identifikacijo novih genetskih sprememb, ki vplivajo na klinične, fenotipske in/ali prognostične lastnosti bolezni. Te novo ugotovljene spremembe, ki bodo v prihodnosti mogoče postale nove podvrste, zaenkrat uvrščamo v še eno dodatno skupino: B-ALL z drugimi



genetskimi spremembami. Sem spadajo preureditve genov *DUX4*, *MEF2D*, *ZNF384* in *NUTM1*, fuzija genov *IGH::MYC* in spremembe *PAX5alt* ali *PAX5 p.P80R*. Zanimivo je, da B-ALL s preureditvami genov *ZNF384*, *DUX4* ali *PAX5 p.P80R* kažejo po zdravljenju, ali že ob diagnozi, monocitno diferenciacijo (izgubijo imunofenotip značilen za B-celice), kar potrjuje koncept plastičnosti levkemičnih linij. Ta plastičnost ima velik vpliv na obravnavo bolezni, vključno z imunofenotipskim določanjem prisotnosti merljivega preostanka bolezni (MRD) (v primeru spremembe celične linije bi lahko podcenili MRD, če te spremembe ne bi upoštevali).

V našem laboratoriju ob diagnozi B-ALL vedno izvedemo kariotipizacijo/preiskavo FISH (fluorescenčna *in situ* hibridizacija). Iščemo t(9;22), preureditve gena *KMT2A* (najpogosteje t(4;11)) ter prisotnost hipodiploidnega kariotipa, ki imajo napovedno neugoden pomen in prisotnost napovedno ugodnega hiperdiploidnega kariotipa. Prisotnost hiperdiploidnega kariotipa vedno potrdimo s preiskavo FISH. Pri pediatričnih bolnikih dodatno izvedemo še preiskavo FISH za napovedno ugodno t(12;21), ki je kriptična in je zato na kariotipu ne vidimo ter za intrakromosomsko amplifikacijo kromosoma 21 (*iAMP21*). Ko izločimo našete ponavljajoče spremembe nadaljujemo s preiskavo FISH za preureditev gena *CRLF2*. Če je ta negativen, je tak bolnik kandidat za izvedbo preiskave NGS s panelom fuzijskih genov. V primeru neuspešne ali nepopolne kariotipizacije oziroma ko rezultati kariotipizacije niso zanesljivi, izvedemo presejalni test tipizacije levkemij (hkratni vgnezdni RT-PCR; produkte zaznamo z gelsko elektroforezo), ki nam omogoča detekcijo 28 kromosomskih translokacij in več kot 145 klinično pomembnih kromosomskih prelomnih točk. Če s presejalnim testom ugotovimo prisotnost katerega izmed fuzijskih genov, s potrditvenim testom opredelimo še vrsto prepisa fuzijskega gena. Prisotnost fuzijskega gena nam omogoča spremljanje MRD med in po končanem zdravljenju. MRD postaja vedno bolj pomemben kot neodvisni napovedni dejavnik za oceno tveganja ponovitve bolezni in za izbiro zdravljenja. V našem laboratoriju lahko z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR-polimerase chain reaction) pri B-ALL spremljamo MRD za tri različne fuzijske gene: *BCR::ABL1*, *TCF3::PBX1* in *ETV6::RUNX1*. Za določanje MRD pri sledenju bolezni je nujno, da smo iz vzorca ob postavitvi diagnoze določili vrsto prepisa, ki mu lahko sledimo. Preiskavo vedno izvajamo na isti vrsti vzorca (kostni mozeg, periferna krvi). Pri vseh akutnih levkemijah je zaradi boljše občutljivosti vzorec izbora kostni mozeg. Brez izhodiščnega vzorca je sledenje MRD nemogoče.

MRD lahko določamo tudi s pomočjo imunofenotipizacije. Omejitev metode predstavljata nizko število celic v vzorcu kostnega mozga/periferne krvi zaradi česar meja zaznave ni dovolj nizka, da bi z gotovostjo potrdili odsotnost MRD in kontaminacija kostnega mozga s periferno krvjo, kar lahko privede do lažno negativnih rezultatov.

Tabela 1: WHO klasifikacija hematolimfoidnih tumorjev, 5. izdaja: razdelitev B-ALL

---

B-celična limfoblastna levkemija/limfom, NOS
B-celična limfoblastna levkemija/limfom z visoko hiperdiploidnostjo
B-celična limfoblastna levkemija/limfom s hipodiploidnostjo
B-celična limfoblastna levkemija/limfom z iAMP21
B-celična limfoblastna levkemija/limfom s fuzijo <i>BCR::ABL1</i>
B-celična limfoblastna levkemija/limfom z <i>BCR::ABL1</i> podobnimi lastnostmi
B-celična limfoblastna levkemija/limfom s preureditvami gena <i>KMT2A</i>
B-celična limfoblastna levkemija/limfom s fuzijo <i>ETV6::RUNX1</i>
B-celična limfoblastna levkemija/limfom z <i>ETV6::RUNX1</i> podobnimi lastnostmi
B-celična limfoblastna levkemija/limfom s fuzijo <i>TCF3::PBX1</i>
B-celična limfoblastna levkemija/limfom s fuzijo <i>IGH::IL3</i>
B-celična limfoblastna levkemija/limfom s fuzijo <i>TCF3::HLF</i>
B-celična limfoblastna levkemija/limfom z drugimi genetskimi spremembami

---

## T-ALL

T-limfoblastne levkemije (T-ALL) so neoplazme prekursorskih celic T. T-ALL na podlagi imunofenotipizacije razdelimo na T-ALL, NOS in zgodnjo prekursorško T limfoblastno levkemijo. Kljub znatnemu napredku na področju razumevanja genetskega ozadja T-ALL, še vedno ni dovolj podatkov, da bi, kot pri B-ALL, T-ALL razdelili na genetsko definirane podtipе, ki bi imeli tudi klinični pomen. T-ALL predstavlja 20-25% vseh ALL pri odraslih in 10-15% ALL pri otrocih. Citogenetske spremembe najdemo pri 50-70% bolnikov s T-ALL. Poleg kariotipizacije vedno izvedemo preiskavo FISH s katero iščemo preureditve genov *KMT2A* (11q23), *TCR A/D* (14q11), *TLX1* (10q24), *TLX3* (5q35) in delecijo kratkega kraka kromosoma 9.

## Viri

1. Allagio R, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36(7):1720-1748.

## Novosti v klasifikaciji novotvorb limfatičnega tkiva

*Katarina Reberšek*

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

*katarina.rebersek@kclj.si*

Klasifikacija limfatičnih novotvorb, ki je bila leta 2016 podana s strani WHO (World Health Organization) (4.izdaja), je nadgrajena leta 2022 tako s strani WHO (5.izdaja) kot tudi s strani ICC (International Consensus Classification). Obe klasifikaciji sta osnovani na patoloških, kliničnih ter, kjer je relevantno, molekularnih značilnostih. Razlike med njima so v (re)organizaciji in terminologiji že znanih entitet ter priznavanju novih, ki jih določajo klinični podatki, imunofenotip in molekularne značilnosti. WHO ne vključuje več začasnih entitet, določene entitete iz 4.izdaje WHO klasifikacije so smatrane kot samostojne v obeh klasifikacijah. Obe klasifikaciji navajata posodobljene nujne in priporočljive diagnostične kriterije vsake entitete.

Med najbolj vidnimi spremembami v WHO je vključitev tumorjem podobnih lezij, nemalignih stanj, ki se lahko predstavljajo kot limfom v izogib napačne postavitve diagnoze limfoma, navedene so tudi pomembne diferencialne diagnoze.

Pri zrelih novotvorbah celic B WHO priznava 3 podtipe klonske limfocitoze celic B (MBL) ob upoštevanju absolutne koncentracije klonalnih limfocitov B ter imunofenotipa, ICC MBL ne ločuje na osnovi absolutne koncentracije ter v nasprotju z WHO še zmeraj priznava MBL tipa atipične KLL. Pri KLL WHO uvaja prolimfocitno napredovanje KLL ter umika B-prolimfocitno levkemijo kot entiteto, medtem ko jo ICC še zmeraj priznava. Izraz »Richterjev sindrom« ni več zaželen v nobeni od klasifikacij. WHO variantno dlakastocelično levkemijo klasificira kot splenični B-celični limfom/levkemija z izrazitimi jedrci. Kriteriji za postavitve diagnoze limfoplazmicitnega limfoma (LPL) so se spremenili, in sicer je za ICC že diagnostičnega pomena, ko je infiltracija s klonalnimi limfoplazmicitnimi agregati v biopsiji kostnega mozga <10%, za WHO je še zmeraj diagnostičnega pomena infiltracija  $\geq 10\%$  kostnega mozga.

Pediatrični nodalni limfom obrobni celic (LOC) je v ICC opisan kot začasna entiteta, WHO jo prepoznava kot samostojno entiteto. Za ločevanje od reaktivnega stanja je potreben dokaz klonalne preureditve gena za imunoglobuline, vendar je težko razlikovanje of pediatričnega tipa folikularnega limfoma. Obe klasifikaciji kot samostojno entiteto prepoznava primarni kožni LOC,

ki je na osnovi morfologije in imunofenotipa podoben nodalnemu in ektranodalnemu LOC, vendar brez genetskih sprememb, ki se pojavljajo pri le-teh.

Na področju folikularnega limfoma (FL) je največ sprememb pri WHO z uvedbo 3 (morfoloških) podtipov, klasična določitev stopnje, osnovana na deležu centroblastov, je opsijska, v nasprotju z ICC, ki ga še zmeraj ohranja.

Definicija limfoma plaščnih celic (LPC) z genetskega vidika poleg preureditev *CCND1* vključuje tudi kriptične preureditve promoterjev *IGκ* ali *IGλ* s *CCND1* ali translokacije, ki vključujejo *CCND2* ali *CCND3*.

V nasprotju z ICC WHO vključuje transformacijo indolentnih B celičnih limfomov kot novo družino/entiteto, v katero vključuje agresivne limfome, ki nastanejo iz nizkomalignnih B limfomov (Richterjeva transformacija, prehod FL in LOC v difuzni velikocelični B limfom (DVCBL)). Transformirane celice imajo običajno izhodiščni imunofenotip nizkomalignnega limfoma in se lahko prezentirajo kot nodalna ali ekstranodalna bolezen. Sum na transformacijo obstaja ob večjih bezgavkah, višjem LDH ali pojavu sistemskih simptomov, za končno potrditev je potrebna biopsija.

V družini velikoceličnih B limfomov WHO izraz difuzni priporoča le za boleznih z difuznim načinom razrasti, sicer priporoča izraz velikocelični B limfom. Burkittovem limfomu podoben limfom z nepravilnostjo 11q, ki je bil v prejšnji klasifikaciji predstavljen kot začasna entiteta, kot takega še zmeraj prepoznava ICC z novo terminologijo velikocelični B limfom z nepravilnostjo 11q, WHO pa ga prepoznava kot samostojno entiteto znotraj družine velikoceličnih B limfomov pod imenom visokomalignni B celični limfom z nepravilnostjo 11q.

Kot začasna entiteta med FL je bil v prejšnji klasifikaciji predstavljen velikocelični B limfom s preureditvijo *IRF4*, ki ga kot takega še zmeraj smatra ICC, WHO ga je najverjetneje zaradi imena prestavil v kategorijo velikoceličnih B limfomov, vendar kot samostojno entiteto.

Visokomalignni B celični limfom z *MYC* in *BCL2* in/ali *BCL6* preureditvijo (double hit in triple hit limfomi) je ICC razdelil na 2 entiteti, in sicer visokomalignni B celični limfom s preureditvijo *MYC* in *BCL2* (z ali brez preureditve *BCL6*) ter na začasno entiteto visokomalignni B celični limfom s preureditvijo *MYC* in *BCL6*. WHO limfome s preureditvijo *MYC* in *BCL2* imenuje kot DVCBL/visokomalignni B celični limfom (HGBCL) s preureditvijo *MYC* in *BCL2*. Zaradi manj bioloških značilnosti WHO limfome s preureditvijo *MYC* in *BCL6* gleda kot podtip znotraj DVCBL, brez dodatne opredelitve/HGBCL, brez dodatne opredelitve. V prejšnji klasifikaciji je veljalo, da limfom z morfologijo DVCBL/HGBCL, ki izraža TdT, spada v kategorijo limfoblastnih levkemij/limfomov. Ko je CD34 negativen, in so prisotne izolirane ali double hit preureditve *MYC*, jih obe novi klasifikaciji smatrata kot DVCBL/HGBCL, brez določene opredelitve, z ekspresijo TdT.

Obe klasifikaciji priznavata primarno bolezen hladnih aglutininov (CAD) kot entiteto, ki se razlikuje od LPL in IgM monoklonske gamopatije neznanega pomena (MINP), in sicer ICC kot začasno entiteto, WHO pa kot svojo entiteto v družini monoklonskih gamopatij, kamor uvršča še ne-IgM MINP, IgM MINP, slednjega ICC omenja za LPL in ga deli na IgM tipa plazmatk ter IgM, brez določene opredelitve. Monoklonsko gamopatijo ledvičnega pomena, ki ga ICC uvršča znotraj ne-IgM MINP, WHO priznava kot entiteto znotraj družine monoklonskih gamopatij.

Diseminirani plazmocitom ICC razdeli glede na genetske preureditve, WHO jih kot samostojne entitete ne priznava. Razlike med klasifikacijama so tudi v novi terminologiji primarne amiloidoze, ICC ločuje tudi med sistemsko in lokalizirano obliko amiloidoze. Prav tako ICC ločuje med solitarnim in ektramedularnim plazmocitomom, WHO ju združuje v eno kategorijo. V nasprotju z ICC WHO kot entiteto priznava tudi sindrom AESOP.

Na področju zrelih novotvorb celic T/NK so v WHO spremembe predvsem v terminologiji, limfoproliferativne bolezni so spremenjene v limfome ter obratno, kjer izraz bolje opisuje naravo bolezni. Iz imen so umaknjene specifikacije, ki se nanašajo na lokacije, kjer se limfom pojavlja tudi na drugih mestih (npr. ekstranodalni limfom NK/T celic, nazalni v ekstranodalni NK/T celični limfom). V obeh klasifikacijah so dodane nove entitete (primarni kožni periferni T celični limfom, brez dodatne opredelitve) ter prej samostojne bolezni (angioimunoblastni T celični limfom, folikularni T celični limfom, nodalni periferni T celični limfom s fenotipom folikularnih pomočniških limfocitov) so po novem zajete v družini nodalni T celični limfomi s fenotipom folikularnih pomočniških limfocitov. V nasprotju z ICC je WHO Sezaryjev sindrom, čeprav tesno povezan s fungoidno mikozo, premaknil v kategorijo zrelih T/NK celičnih levkemij zaradi klinične prezentacije in diferencialne diagnoze z drugimi zreliimi T/NK celičnimi levkemijami.

## Viri

1. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBO, Berti E et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1720-48.
2. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, Quintanilla-Martinez L, Swerdlow SH, Anderson KC et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood*. 2022;140(11):1229–53.
3. Falini B, Martino G, Lazzi S. A comparison of the International Consensus and 5th World Health Organization classifications of mature B-cell lymphomas. *Leukemia*. 2023;37:18–34.

# ZDRAVLJENJE MDS IN AML PRI STAREJŠIH BOLNIKI MED 65 – 75 LET (ZHS)

## Pomen biologije AML na izbiro prvega zdravljenja

*Enver Melkić, Neva Kavčič*

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

*enver.melkic@kclj.si, neva.kavcic@kclj.si*

Starost bolnika je eden najpomembnejših neodvisnih napovednih dejavnikov, ki vpliva na slabši izhod zdravljenja akutne mieloične levkemije (AML). Rezultati zdravljenja bolnikov, starejših od 60 let, ki so bili vključeni v različne klinične raziskave so pokazali večinoma slabše rezultate od povprečnih odzivov na zdravljenje bolnikov mlajših od 60 let. Pri starejših popolni odziv dosežemo zgolj med 50 – 60 % bolnikov. Trajanje remisije pa je običajno kratko, manj kot 12 mesecev. Ker je le 30-40 % bolnikov starejših od 65 let dejansko vključenih v raziskave, je izhod zdravljenja v vsakodnevni praksi verjetno še slabši. Slabši rezultati zdravljenja starejših bolnikov so posledica predvsem notranjih značilnosti bolezni oziroma drugačne biologije levkemije in hkrati dejavnikov, povezanih z bolnikom samim, na primer manjša rezerva kostnega mozga, slabša toleranca za kemoterapijo in pridružene bolezni.

Starostne meje za opredelitev bolnikov z AML kot "starejših" so sporne, zato so v različnih študijah bile sprejete mejne vrednosti od 55 do 70 let. Glede na postopno staranje splošne populacije in zdravljenje s presaditvijo krvotvornih matičnih celic tudi pri starejših bolnikih, pa trenutne raziskave upoštevajo predvsem starost nad 65 – 70 let za opredelitev bolnikov za starejše.

AML pri bolnikih starejših od 65 let ima več skupnih bioloških lastnosti s sekundarnimi AML kot so; večvrstna displazija, drugačen fenotip, več neugodnih citogenetskih sprememb in večjo izraženo genov za odpornost proti zdravljenju. Uporaba različnih bioloških markerjev, nam lahko pomaga ločiti bolnike na tiste, ki jim agresivna kemoterapija dejansko koristi, od tistih, ki jih zdravimo manj agresivno ali celo odločimo za podporno zdravljenje. Tako bomo s časom oblikovali strategijo zdravljenja, ki bo manj tvegana glede zapletov zdravljenja in bo izboljšala preživetje in kakovost življenja.

Nasprotno od napredka, doseženega pri mlajših odraslih, je splošni izid zdravljenja AML pri starejših bolnikih izjemno slab. Številne študije so ocenjevale učinke intenzivne kemoterapije in

pokazale, da se s starostjo zmanjšata tako stopnja popolnega odgovora (CR) kot čas trajanja remisije (RFS). Pri bolnikih, starih nad 60 let, je stopnja CR po intenzivnem zdravljenju med 30 in 50 %. Pri bolnikih, starih med 70 - 75 let in nad 75 let pa je stopnja CR 38 % in 22 %. Še pomembneje pa je, da je večina raziskav pokazala, da je mediana RFS pri bolnikih z AML, starejših od 60 let, bistveno nižja, tj. 12 mesecev, v nasprotju z mlajšimi odraslimi do 50 let, pri katerih je mediana RFS skoraj 24 mesecev, 5-letni RFS pa 25-40 %. Tudi različne druge študije poročajo o triletnem RFS, ki je pri bolnikih z AML, starejših od 60 let, manjši od 10 %. Pri mlajših bolnikih pa 5-letni RFS znaša več kot 40 %. Zdi se, da so slabši rezultati zdravljenja predvsem posledica razlik v biologiji bolezni starejših bolnikov. Poleg tega je veliko dejavnikov povezanih z bolnikom, ki lahko vplivajo na uspešnost zdravljenja, na primer manjša toleranca za intenzivno kemoterapijo, ki lahko vodi v povečano tveganje za hude okužbe, starostna izguba fizioloških rezerv v delovanju srca, pljuč in ledvic. Poleg tega imajo starejši bolniki pogosto tudi druge pridružene bolezni in socialno-ekonomske težave. Dejavniki, ki vplivajo na slabše preživetje kot je starost bolnikov in pridružene bolezni se dodatno prepletajo z drugimi biološkimi lastnostmi same bolezni.

### **Dejavniki, povezani z boleznijo**

Biološka heterogenost akutne mieloične levkemije (AML) zahteva individualizirano pristop k zdravljenju, kjer je potrebno upoštevati citogenetsko analizo in mutacijski profil pred začetkom zdravljenja. Te značilnosti so neodvisni napovedovalci uspeha standardnega intenzivnega indukcijskega zdravljenja. Ocena fizične primernosti bolnika v povezavi z vsemi biološkimi značilnostmi lahko izboljša napoved uspeha pri intenzivni kemoterapiji. V splošnem so citogenetske nepravilnosti in mutacijski profili, ki predstavljajo večje tveganje in so opredeljeni v evropskih smernicah za genetsko stratifikacijo tveganja Leukemia Net, pogostejši pri starejših bolnikih. Pri starejših bolnikih so druge biološke značilnosti AML tudi pogostejše, kot so razvoj iz predhodnih mieloičnih neoplazem in pomembna napovedna vrednost izida zdravljenja. Čeprav so za mlajše bolnike sprejeta in potrjena prognostična, njihova napovedna vrednost ni bila določena pri starejših bolnikih, ki prejemajo manj intenzivne možnosti zdravljenja, kot je na primer kombinacija venetoklaxa (VEN) z hipometilirajočimi agensi (HMA).

### **Citogenetske nepravilnosti in starost**

V analizi dveh raziskav SWOG je bil odstotek bolnikov, starejših nad 75 let, s citogenetiko z ugodnim tveganjem le 4 %, medtem ko je bila citogenetika s slabim tveganjem prisotna pri 51 % bolnikov. V nasprotju s tem so pri 17 % bolnikov, mlajših od 56 let, ugotovili citogenetske spremembe z ugodnim tveganjem, pri le 35 % pa citogenetske spremembe, ki so jih povezovali s

slabim tveganjem. Neugodne citogenetske spremembe, ki so jih opažali pri starejših bolnikih, so vključevale predvsem izgubo celega ali dela kromosomov 5 ali 7. Tudi v podskupinami bolnikov z enakimi citogenetskimi tveganji, so se rezultati zdravljenja s starostjo zmanjševali, stopnja razlike v izidu zdravljenja med starejšimi in mlajšimi bolniki je bila veliko večja v skupini z ugodnim tveganjem kot v skupini z neugodnim tveganjem. Pokazalo se je tudi, da se kompleksni kariotip po 60. letu starosti znatno poveča, kar kaže na več genetskih dogodkov, vključno z epigenetskimi spremembami kromosomov. Prisotnost katere koli vrste monosomije pomeni slabo prognozo. Pri bolnikih z dvema ali več avtosomnimi monosomijami ali eno avtosomno monosomijo v kombinaciji z vsaj eno drugo strukturno kromosomsko nepravilnostjo je 4-letno skupno preživetje le 4-odstotno.

### **Molekularne nepravilnosti in starost**

Genetsko raznolikost AML na molekularnem nivoju in njeno uporabnost pri izbiri zdravljenja šele začnemo razumevati. V zadnjem desetletju je bil dosežen velik napredek na tem področju. Številne študije so ocenjevale razširjenost in prognostični vpliv specifičnih genetskih sprememb pri starejših bolnikih z AML. V eni od pomembnih publikaciji so Papaemmanuil in sod. opredelili na tisoče gonilnih (driver) mutacij v več kot 70 genomskih regijah. Analiza je pokazala, da je število gonilnih mutacij, neodvisno od bolnikove starosti in stopnje levkocitoze, povezano s slabšim celokupnim preživetjem, kar kaže na to, da je starost bolnika verjetno pomembna za nastajanje mutacij, ki se sčasoma razvijejo v določeni krvotvorni liniji. Kar zadeva že znane prognostične označevalce ugodnega tveganja, se delež bolnikov z izolirano NPM brez sočasne mutacije FLT3-ITD, zmanjšuje po 60. letu starosti. Za razliko od mlajših bolnikov imajo starejši bolniki z mutacijo NPM1, ki so negativni na FLT3-ITD, sicer višjo stopnjo popolne remisije (CR), vendar se čas trajanja remisije ali celokupno preživetje teh bolnikov ne podaljša. Nasprotno pa delež bolnikov z bialelno mutacijo CEBP $\alpha$  ni povezan s starostjo. Raziskave kažejo, da imajo starejši bolniki nasploh večji delež mutacij, ki so povezane s slabšo prognozo. Med te mutacije prištevamo: ASXL1, TET2 in DNMT3A.

Mutacija ASXL1 je petkrat pogostejša pri bolnikih, starejših od 60 let kot pri mlajših od 60 let in je povezana z manjšo stopnjo doseženih remisij, krajšim časom remisije in krajšim celokupnim preživetjem pri tistih bolnikih, ki so sicer razvrščeni v skupino ELN z ugodnim tveganjem.

Mutacija TET2 je tudi pogostejša pri bolnikih starejših od 60 let. V tej skupini bolnikov jo dokažemo v približno četrtini primerov, v primerjavi z mlajšimi bolniki, pri katerih jo dokažemo pri manj kot 10 % primerov. Pri bolnikih vseh starosti s citogenetskimi spremembami, ki pomenijo srednje tveganje, prisotnost mutacije TET2 napoveduje krajše skupno preživetje.



Mutacija DNMT3A je prisotna pri približno tretjini bolnikov, tako starejših kot mlajših od 60 let, z de novo, citogenetsko normalno AML, vrsta mutacije DNMT3A različno vpliva na preživetje glede na starost bolnika. Pri starejših bolnikih je znano, da ima ta mutacija slabši prognostični pomen.

Starejši bolniki z mutacijo R882-DNMT3A imajo bistveno krajši čas dosežene remisije (3 % proti 21 % v treh letih) in celokupno preživetje (4 % proti 24 % v treh letih). Pri mlajših bolnikih z mutacijo R882-DNMT3A te razlike niso opazili. Mutacije R882-DNMT3A so bile povezane s 76-odstotno povečanim tveganjem za smrt po prilagoditvi statusa mutacije NPM1 in FLT3-ITD.

Nekatere genetske mutacije so zelo specifične za sekundarno AML. Te vključujejo mutacije v SRSF2, SF3B1, U2AF1, ZRSR2, ASXL1, EZH2, BCOR ali STAG2 [20]. Kadar se te mutacije pojavijo pri bolnikih z AML, povezano z zdravljenjem, ali de novo AML, so klinično-patološke značilnosti bolezni in klinični potek podobni bolnikom s sekundarno AML, pri katerih sta prognoza in odziv na zdravljenje pogosto slaba.

### Izbira zdravljenja glede na biološke značilnosti AML

V retrospektivni raziskavi v enem centru v Franciji so na skupini bolnikov starih med 60 in 93 let (mediana 69 let) primerjali prognostični vpliv molekularnih in citogenetskih označevalcev na preživetje starejših bolnikov z AML glede na intenzivnost zdravljenja. Mediana starost bolnikov je bila 69 let (razpon od 60 do 93 let). Kariotip je bil v času odločitve o zdravljenju na voljo le pri 58,6 % primerov v celotni skupini. Mediana čas spremljanja celotne skupine je bila 7,62 meseca. Raziskava je pokazala, da so genetske značilnosti bistvene za odločitev o načinu zdravljenja. Bolniki z mutacijo IDH2 (vsaj različico R140Q), NPM1+ in FLT3TKD+, ne pa FLT3ITD+ so imeli boljše preživetje, če so jih zdravili z intenzivno kemoterapijo (antraciklin in citarabin) v primerjavi z manj intenzivnimi načini zdravljenja kot so nizki odmerki citarabina, azacitidin in decitabin (mediano preživetje 10,1 proti 2,9 meseca,  $p < 0,001$ ). Pri bolnikih z NPM1-FLT3-ITD+ ni bilo razlike v preživetju ne glede na strategijo zdravljenja (mediano preživetje 7,56 vs. 8,15 vs. 1,15 meseca pri intenzivnem, manj intenzivnem in najboljšem podpornem zdravljenju (BSC)  $p = 0,2$ ). V skupini bolnikov z neugodnim tveganjem so bili režimi zdravljenja z nižjo intenzivnostjo boljši tako v preživetju kot času brez napredovanja bolezni, vendar le pri bolnikih, starejših od 70 let (mediano preživetje 9,4 proti 7,4 meseca,  $p = 0,009$ ). Pri bolnikih z alogeno presaditvijo matičnih celic, ki so bili vsi stari pod 70 let, so imeli bolniki, pri katerih so presaditev opravili v prvi remisiji, ne glede na citogenetsko tveganje, daljše obdobje brez napredovanja bolezni (mediana 63 mesecev) v primerjavi s tistimi, ki so jih zdravili samo s kemoterapijo (mediana 15,6 mesecev,  $p = 0,003$ ), kar pa se ni prevedlo v daljše preživetje. (2)

V drugi raziskavi v MD Anderson so raziskovali odgovore na zdravljenje z venetoklaksom v kombinaciji s HMA ali nizkimi odmerki citarabina pri starejših bolnikih (mediana starost 74 let) z AML glede na molekularno-genetske značilnosti. Bolniki z mutacijami NPM1 in IDH2 so imeli najboljši odgovor na zdravljenje, daljše obdobje brez napredovanja bolezni in daljše preživetje kot druge skupine bolnikov. 2-letno preživetje bolnikov z mutacijo NPM1, ki so jih zdravili z venetoklaksom v kombinaciji s HMA ali nizkimi odmerki citarabina je bilo več kot 70%, celo boljše kot pri tistih, ki so jih zdravili z intenzivno kemoterapijo (2-letno preživetje manj kot 40%). V raziskavi so jasno pokazali, da je odpornost na zdravljenje z venetoklaksom v kombinaciji z HMA ali citarabinom povezana z dvema mehanizmoma: aktivacijo kinaznih signalnih poti (FLT3, RAS) in mutacijo TP53. (3)

### Zaključek

Zdravljenje AML pri bolnikih, starejših od 60 let, ostaja velik izziv, saj še vedno ni povsem jasnih priporočil o izbiri optimalnega zdravljenja glede na klinične značilnosti bolnika in molekularne ter citogenetske značilnosti bolezni.

Uvedba novih načinov zdravljenja, ki temeljijo na kombinacijah z venetoklaksom, je izboljšal prognozo bolnikov z AML, ki niso primerni za intenzivno kemoterapijo. Za nekatere podskupine bolnikov (mutacija FLT3ITD, mutacija TP53) pa tudi omenjeno zdravljenje ni optimalno, v raziskavah preizkušajo nove načine zdravljenja.

### Viri

1. Charrot, S., Armes, H., Rio-Machin, A. and Fitzgibbon, J. (2020), AML through the prism of molecular genetics. *Br J Haematol*, 188: 49-62. <https://doi.org/10.1111/bjh.16356>
2. Heiblig M, Labussière-Wallet H, Nicolini FE, Michallet M, Hayette S, Sujobert P. Prognostic Value of Genetic Alterations in Elderly Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Single Institution Experience. *Cancers (Basel)*. 2019 Apr 22;11(4):570. doi: 10.3390/cancers11040570. PMID: 31013658; PMCID: PMC6520979.
3. DiNardo CD, Tiong IS, Quaglieri A, MacRaid S, Loghavi S, Brown FC. Molecular patterns of response and treatment failure after frontline venetoclax combinations in older patients with AML. *Blood*. 2020 Mar 12;135(11):791-803. doi: 10.1182/blood.2019003988. PMID: 31932844; PMCID: PMC7068032.
4. Roloff GW, Odenike O, Bajel A, Wei AH, Foley N, Uy GL. Contemporary Approach to Acute Myeloid Leukemia Therapy in 2022. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2022 Apr;42:1-16. doi: 10.1200/EDBK\_349605. PMID: 35658497.
5. Gina Keiffer, Neil Palisiano. Acute Myeloid Leukemia: Update on Upfront Therapy in Elderly Patients. *Current Oncology Reports* 2019: doi.org/10.1007/s11912-019-0823-1

## Vpliv bolnikovih značilnosti na izbiro prvega zdravljenja AML

Saša Anžej Doma<sup>1</sup>, Mojca Dreisinger<sup>2</sup>

1 Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana

2 Oddelek za hematologijo in hematološko onkologijo, Klinika za interno medicino, Univerzitetni klinični center Maribor

Vedno boljše poznavanje biologije akutne mieloblastne levkemije (AML) in razvoj številnih novih zdravil v zadnjem desetletju sta izrazito spremenila koncept zdravljenja; če smo prej 50 let uporabljali le en kemoterapevtski režim (antraciklin v kombinaciji s citarabinom; "3+7"), je sedaj zdravljenje individualizirano, prilagojeno bolnikovim psihofizičnim sposobnostim/komorbidnostim in molekularno-citogenetskimi značilnostim AML. Medtem, ko se je preživetje mlajših bolnikov z uporabo tarčnih zdravil, ki jih dodajamo intenzivni kemoterapiji ter napredkom v zdravljenju z alogensko presaditvijo krvotvornih matičnih celic (PKMC) izrazito izboljšalo, pri starejših bolnikih nismo tako uspešni. Razloga sta dva; da tako intenzivna kemoterapija kot PKMC za večino starejših bolnikov nista primerna postopka zdravljenja in da imajo starejši pogosteje kot mlajši bolniki neugodne citogenetske (kompleksen kariotip) in molekularno genetske najdbe (*TP53*, *SRSF2* in *ASXL1*). Več je tudi sekundarnih in s predhodno terapijo povezanih AML, ki so neodvisno povezane s slabšim izhodom. AML z ugodno citogenetiko (CBF-AML, *NPM1*) so pri starejših bolnikih bistveno redkejše kot pri mlajših.

Starejši bolniki z AML imajo slabši izhod kot mlajši. Na splošno velja, da če psihofizično stanje dopušča, tudi starejši bolniki profitirajo od intenzivne kemoterapije, saj nizko intenzivne sheme običajno ne vodijo v trajno ozdravitev. Hipometilacijska zdravila (HMA) v monoterapiji danes skoraj ne prihajajo v poštev, vseeno pa imajo prednost pred zgolj podporno terapijo. Danes temelj zdravljenja starejših bolnikov predstavljajo kombinacije HMA z venetoklaksom, slednjega uporabljamo tudi v kombinaciji z intenzivnejšimi shemami in tarčnimi zdravili.

Pri oceni bolnikove sposobnosti za intenzivno kemoterapijo je bolj kot sama starost pomembna dobra opredelitev stanja srca, pljuč, ledvic in možganov, ker ta opredeljujejo zgodnjo smrtnost, povezano z zdravljenjem. Slabše splošno stanje se z naraščajočo starostjo prevede v večjo zgodnjo smrtnost, povezano z intenzivno kemoterapijo, pa tudi spremljajočih bolezni je s starostjo več. Z laboratorijskimi preiskavami (jetrni testi, ocena ledvične funkcije, proBNP in troponin), UZ srca in spirometrijo ocenimo delovanje organov, osnovno oceno zmogljivosti pa po ECOG in Karnofsky točkovniku. Za oceno komorbidnosti lahko uporabimo prilagojen Charlson comorbidity index (CCI)

(Tabela 1). Če imajo bolniki tako ECOG kot CCI  $\leq 2$ , so z medicinskega stališča ocenjeni kot »fit«, v kolikor sta ECOG in/ali CCI 3 točke, so »unfit«, če sta ECOG in CCI  $\geq 3$ , pa so to krhki bolniki.

	<b>Točke</b>
Pridružena bolezen	
miokardni infarkt	1
srčno popuščanje	1
cerebrovaskularna bolezen	1
želodčna razjeda	1
jetrna bolezen (blaga; kronični hepatitis, ciroza)	1
sladkorna bolezen (brez prizadetosti organov)	1
pljučna bolezen	1
vezivnotkivna bolezen	1
sladkorna bolezen (s prizadetostjo organov)	2
ledvična bolezen (zmerna ali huda; kreatinin $>260 \mu\text{mol/l}$ , dializno zdravljenje ali presaditev)	2
solidni tumor (brez metastaz)	2
jetrna bolezen (zmerna ali huda; ciroza s portalno hipertenzijo in varicami)	3
solidni tumor (z metastazami)	6

Tabela 1. Prilagojen Charlson comorbidity index (CCI).

Uporabljajo se lahko tudi drugi točkovniki, ki pomagajo pri napovedi izhoda zdravljenja AML z intenzivno kemoterapijo: HCT-CI (hematopoietic stem cell transplantation – comorbidity index), ACE-27 (adult comorbidity evaluation), GA (strukturirana geriatrična ocena), 6-minutni test hoje. Ti točkovniki dopolnijo vtis, ki ga izkušen zdravnik dobi ob pregledu bolnika in pregledu laboratorijskih izvidov. Lansko leto so izšle kardio-onkološke smernice, ki podrobneje narekujejo preiskave, pomembne za kardiološko oceno pred pričetkom zdravljenja (npr. za oceno antraciklinske kardiotsičnosti ob relapsu AML) in tudi ukrepanje ob potrjeni kardiovaskularni bolezni.

### **Intenzivna kemoterapija (DA3+7, CPX-351)**

Prihaja v poštev za bolnike, ki so »fit« in brez ali z malo pridruženih boleznimi. Klasična shema DA3+7 in kasnejše konsolidacijsko zdravljenje s citarabinom je še posebej primerno za bolnike s core-binding factor AML (CBF-AML), ker je le-ta dobro občutljiva na citarabin. Dodatek gemtuzumab

ozogamicina (GO) dodatno izboljša izhod teh bolnikov, dodajamo ga lahko pa tudi drugim bolnikom s CD33 pozitivno AML, razen pri AML z neugodnim tveganjem. Shema DA3+7 je primerna tudi za druge starejše fit bolnike z ugodnim ali vmesnim tveganjem (AML z bialelno *CEBPA*, *NPM1* mutacijo), pri čemer bolniki s *FLT3* mutacijo prejmejo tudi midostaurin. Uporaba GO pri starejših bolnikih zahteva razmislek zaradi hepatotoksičnosti, a uporaba GO lahko povzroči hitrejši upad merljive minimalne rezidualne bolezni in tudi zmanjša število konsolidacijskih kemoterapij.

Za bolnike z MR-AML (AML z displastičnimi spremembami) in s sekundarno, s predhodno terapijo povezano AML, je bolj kot standardna shema DA3+7 primeren CPX-351. To je liposomalna formulacija citarabina in daunorubicina, ki je intenzivna kemoterapija z vsemi stranskimi učinki, ki jih srečamo pri drugih intenzivnih shemah. Prednost zdravljenja v primerjavi z DA3+7 je večji odstotek remisij in izboljšano celokupno preživetje, predvsem pri bolnikih, ki zdravljenje nadaljujejo s PKMC.

### Neintenzivne sheme

Standard zdravljenja starejših »unfit« bolnikov danes predstavlja kombinacija HMA z venetoklaksom. Zdravljenje omogoča daljše obdobje brez bolezni, vendar bolniki običajno izgubijo odgovor. Znano je, da imajo najboljši odziv na tovrstno shemo bolniki z AML z *NPM1* in *IDH* mutacijo. Slednji bolniki imajo še daljše preživetje pri kombinaciji azacitidin + ivosidenib (*IDH1* inhibitor), vendar zaenkrat ivosidenib pri nas še ni registriran. Slab odgovor na zdravljenje (katerokoli trenutno dostopno) imajo bolniki s *TP53* mutacijo; ta je pogosto v povezavi z neugodno kompleksno citogenetiko. Kljub boljšemu odgovoru na zdravljenje s kombinacijo HMA+venetoklaks v primerjavi s samim HMA, se to ni prevedlo v boljše celokupno preživetje. Magrolimab je zdravilo, ki cilja na CD47 in se je izkazalo za uspešno pri teh bolnikih; zaenkrat je v uporabi samo v okviru raziskav. Izkazalo se je, da bolniki z akutno monocitno levkemijo načeloma bolj profitirajo od intenzivne kemoterapije kot od kombinacije azacitidina in venetoklaksa, obratno velja za bolnike z *ASXL1* mutacijo. Pri bolnikih z relapsom ali rezistentno AML z mutacijo *FLT3* lahko uporabimo gilteritinib, ki je registriran kot monoterapija. V randomizirani raziskavi faze 3 je bilo takšno zdravljenje uspešnejše in manj toksično od intenzivnega reševalnega zdravljenja s citostatiki.

### Zdravljenje s PKMC

Nemieloablativni ("reduced-intensity") načini kondicioniranja, novosti v imunosupresiji in boljše splošno podporno zdravljenje omogočajo tudi starejšim bolnikom ozdravitev, če dosežejo remisijo s katerokoli od naštetih, intenzivnih ali neintenzivnih shem zdravljenja. Podatki ECOG-ACRIN raziskave so pokazali 43% preživetje bolnikov starosti 60-73 let, ki so bili transplantirani v prvi remisiji. Poudariti velja, da bolniki, ki smo jih sprva ocenili kot neprimerne za intenzivno

zdravljenje in dosežejo remisijo po neintenzivni kemoterapevtski shemi, lahko zdravljenje nadaljujejo s PKMC, če se jim splošno stanje izboljša (lahko je bilo to slabo zaradi AML). Kot alternativa PKMC obstaja oralni azacitidin (prej CC-486), ki je v uporabi kot vzdrževalno zdravljenje po intenzivni kemoterapiji; neodvisno od MRD lahko podaljša celokupno preživetje in preživetje brez bolezni. Pri nas na žalost zaenkrat ni na voljo.

## Viri

1. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* (2022) 140 (12): 1345–1377.
2. Larson RA, Klepin HD. Pretreatment evaluation and prognosis of acute myeloid leukemia in older adults. Dostopno 23.3.2023 na URL: [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com)
3. Bazinet A, Kantarjian HM. Moving toward individualized target-based therapies in acute myeloid leukemia. *Ann Oncol* 2023 Feb;34(2):141-151.
4. De Leeuw DC, Ossenkoppele GJ, Janssen JJWM. Older Patients with Acute Myeloid Leukemia Deserve Individualized Treatment. *Curr Oncol Rep*. 2022 Nov;24(11):1387-1400
5. Jaramillo S, Schlenk RF. Update on current treatments for adult acute myeloid leukemia: to treat acute myeloid leukemia intensively or non-intensively? That is the question. *Haematologica* 2023;108(2):342-352
6. Montesinos P, Recher C, Vives S, Zarzycka E, Wang J, Bertani G, et al. Ivosidenib and Azacitidine in IDH1-Mutated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2022 Apr 21;386(16):1519-1531.
7. Roboz GJ, Ravandi F, Wei AH, Dombret H, Thol F, Voso MT, et al. Oral azacitidine prolongs survival of patients with AML in remission independently of measurable residual disease status. *Blood*. 2022 Apr 7;139(14):2145-2155.
8. Lyon AR, López-Fernández T, Couch LS, Asteggiano R, Aznar MC, Bergler-Klein J, et al, ESC Scientific Document Group, 2022 ESC Guidelines on cardio-oncology developed in collaboration with the European Hematology Association (EHA), the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO) and the International Cardio-Oncology Society (IC-OS): Developed by the task force on cardio-oncology of the European Society of Cardiology (ESC), *European Heart Journal*, Volume 43, Issue 41, 1 November 2022, Pages 4229–4361

## Kdaj bolnika z MDS napotiti na PKMC

*Polona Novak, Klara Šlajpah*

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

*polona.novak@kclj.si*

Biologija in klinični izid pri mielodisplastičnih novotvorbah (MDS) sta izjemno heterogena, zato je napovedovanje tveganja pri bolniku ključnega pomena za odločanje o zdravljenju. Za napovedovanje tveganja pri MDS se uporabljajo prognostični točkovni sistemi, pri čemer je Popravljen mednarodni sistem prognostičnega točkovanja (IPSS-R) že desetletje standard za prognostično opredelitev bolnikov. Temelji na hematoloških in citogenetskih značilnostih, vendar ne upošteva genetskih mutacij. Zaradi tega lahko bolezen pri bolnikih, ki so po oceni IPSS-R uvrščeni v MDS z nizkim tveganjem napreduje hitreje, kot je bilo napovedano. Sekvenciranje naslednje generacije (NGS) je odkrilo ponavljajoče se točkovne mutacije genov, ki so se izkazali za pomembne prognostične označevalce. Do nedavnega ni bilo molekularnega prognostičnega točkovalnega sistema, ki bi bil primeren za vsakodnevno klinično prakso. Pod okriljem Mednarodne delovne skupine za prognozo pri MDS (IWG-PM) je mednarodna skupina ekspertov preučila 2957 bolnikov iz 24 centrov in razvila novi molekularni mednarodni prognostični točkovalni sistem (IPSS-M), ki ga je nato potrdila pri 754 bolnikih.

Ocenili so povezavo med mutiranimi geni in izidom glede na tri končne cilje: preživetje brez levkemije (LFS), celokupno preživetje (OS) in transformacijo v AML. Skupno IPSS-M zahteva 37 parametrov. Poleg petih citogenetskih skupin, števila blastov v kostnem mozgu, ravni hemoglobina in števila trombocitov, vključuje tudi mutacijski status 31 genov. TP53<sup>multihit</sup>, mutacije v FLT3<sup>TKD + ITD</sup> in KMT2A (MLL)<sup>PTD</sup> so se izkazale kot glavni napovednik slabega izida. Ob diagnozi je zato nujno potrebno opredeliti morebitne mutacije v omenjenih genih.

IPSS-M se razlikuje od preostalih prognostičnih sistemov, saj je prilagojen posameznemu bolniku (neprekinjen rezultat s praktično edinstveno vrednostjo za posameznega bolnika), enostavno razumljiv (povečanje ocene za eno enoto pomeni podvojeno tveganje) in ponovljiv (spletni kalkulator, dostopen na <https://mds-risk-model.com/>). IPSS-M porazdeli bolnike v šest skupin tveganja, ki so opredeljene kot zelo nizko (VL) – 14 % bolnikov, nizko (L) – 33 %, zmerno nizko (ML) – 11 %, zmerno visoko (MH) – 11 %, visoko (H) – 14 % in zelo visoko (VH) – 17 % bolnikov. Nemška skupina je ugotovila podobno porazdelitev tveganja med skupinami, z nagnjenostjo h kategorijam z nizkim tveganjem.

V primerjavi z IPSS-R je IPSS-M pokazal večjo natančnost napovedi pri vseh dolgoročnih kliničnih končnih ciljih (OS, LFS, transformacija v AML) in prerazporedil skoraj polovico bolnikov z MDS (46 %). Kot učinkovit prognostični model se je izkazal tudi pri sekundarnem oziroma z zdravljenjem povezanim MDS.

Transformacija v AML je glavni vzrok smrti pri bolnikih z MDS z visokim tveganjem. Alogenska presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC) ostaja edina možnost ozdravitve.

Ker je prognoza MDS zelo različna, od nekaj mesecev do več let, PKMC ni priporočljiva za vse bolnike s to boleznijo. Za oceno primernosti za PKMC moramo upoštevati tako bolnikove značilnosti kot bolezenske dejavnike. Z bolnikom povezani dejavniki, ki vplivajo na izid po PKMC so starost, stanje zmogljivosti, krhkost in pridružene bolezni. Pri opredeljevanju teh dejavnikov si lahko pomagamo z različnimi orodji, kot so stanje zmogljivosti (Karnofsky score) in ocena komorbidnosti (HSCT-CI). Starost sama po sebi ni kontraindikacija za PKMC. V študijah ni bilo bistvene razlike v triletni umrljivosti brez ponovitve bolezni in celokupnem preživetju med bolniki starejšimi od 65 let in bolniki med 55 in 64 let. Bolniki z MDS z visokim tveganjem, brez resnih pridruženih bolezni, so tako lahko kandidati za PKMC vse do starosti 70-75 let. Pri bolnikih z MDS z visokim tveganjem se je izkazalo, da s PKMC izboljšamo preživetje, zato je bolnike z visokem tveganjem, ki so glede na zgoraj navedene značilnosti za ta način zdravljenja primerni, smiselno napotiti na PKMC.

Ker IPSS-R ne vključuje somatskih mutacij, so lahko bolniki napačno razvrščeni kot MDS z nizkim tveganjem, čeprav se bo njihova bolezen v resnici obnašala bolj agresivno zaradi somatskih mutacij z visokim tveganjem (ASXL1, RUNX1, TP53, ETV6). Pri teh bolnikih lahko IPSS-M ponudi boljše napovedovanje in izbiro kandidatov za PKMC. O PKMC je potrebno razmisliti tudi pri bolnikih, ki so na podlagi ocene IPSS-R razvrščeni v srednje tveganje, če imajo pomembno fibrozo kostnega mozga, več kot 5 % blastov v kostnem mozgu, kompleksen kariotip in hude citopenije ( $Hb < 80 \text{ g/L}$ , nevtrofilni granulociti  $< 0,8 \times 10^9/L$ , trombociti  $< 50 \times 10^9/L$ ). Ker so možnosti zdravljenja po zdravljenju s hipometilirajočimi zdravili (HMA) omejene, poznejši izidi pa slabi, moramo o napotitvi na PKMC razmisliti tudi pri bolnikih po odpovedi zdravljenja s HMA, ne glede na prognostično skupino bolezni.

Optimalni čas presaditve ni znan. Preučevali so tri strategije presaditve (ob diagnozi, ob transformaciji in tik pred transformacijo) za vse skupine tveganja. Izkazalo se je, da je pri bolnikih z nizkim in srednjim tveganjem odložena presaditev povečala pričakovano življenjsko dobo, kar je še posebej veljalo za bolnike mlajše od 40 let, medtem ko se je pričakovana življenjska doba bolnikov z MDS s srednjim ali višjim tveganjem po IPSS-R z odložitvijo PKMC skrajšala. V analizo sicer niso bili vključeni podatki o somatskih mutacijah z visokim tveganjem ali refraktarnih citopenijah pri bolnikih z nizkim ali srednje visokim tveganjem.



Na KO za hematologijo UKC Ljubljana je bilo v obdobju od marca 2020 do marca 2023 na PKMC napoteni 24 bolnikov z MDS. Od tega 11 žensk in 13 moških, mediana starost ob postavitvi diagnoze je bila 55,5 (38-71) let. Glede na IPSS-R je imelo 17 % bolnikov MDS z zelo visokim tveganjem, 29 % z visokim tveganjem, 33 % s srednjim tveganjem, 13 % z nizkim tveganjem in 8 % bolnikov MDS z zelo nizkim tveganjem. Pri 16 bolnikih je bil ob diagnozi opravljen NGS in izračunan IPSS-M, ki je 12 % bolnikov razvrstil v skupino z zelo visokim tveganjem, 25 % z visokim tveganjem, 25 % s srednje visokim, 19 % s srednje nizkim in 19 % bolnikov z nizkim tveganjem. Ob upoštevanju IPSS-M je bilo 37 % bolnikov prerazporejenih v skupino z višjim tveganjem, 6 % bolnikov v skupino z nižjim tveganjem, pri 57 % bolnikov pa glede na IPSS-R ni prišlo do spremembe tveganja.

Celovita molekularna analiza je postala nov standard za napovedovanje tveganja pri bolnikih z MDS. Na podlagi temeljite diagnostične in klinične obravnave lahko bolnikom z uporabo sodobnih prognostičnih točkvalnih sistemov kot je IPSS-M zagotovimo najprimernejše zdravljenje.

## Viri

1. Bernard E, Tuechler H, Greenberg PL, Hasserjian RP, Arango Ossa JE, Nannya Y, et al. Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *NEJM Evid.* 2022;1(7):1–14.
2. Baer C, Huber S, Hutter S, Meggendorfer M, Nadarajah N, Walter W, et al. Risk prediction in MDS: independent validation of the IPSS-M—ready for routine? *Leukemia.* 2023;(December 2022):12–5.
3. Franke GN, Lückemeier P, Platzbecker U. Allogeneic Stem-Cell Transplantation in Patients With Myelodysplastic Syndromes and Prevention of Relapse. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk.* 2021;21(1):1–7.
4. Jain AG, Elmariah H. BMT for Myelodysplastic Syndrome: When and Where and How. *Front Oncol.* 2022;11(January):1–13.
5. Snowden JA, Sánchez-Ortega I, Corbacioglu S, Basak GW, Chabannon C, de la Camara R, et al. Indications for haematopoietic cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2022. *Bone Marrow Transplant.* 2022;57(8):1217–39.
6. Villar, S.; Robin M. Allogeneic Stem Cell Transplantation for MDS. *Hemato.* 2021;2:545–555.

## Sledenje kardiovaskularne toksičnosti tekom zdravljenja akutne mieločne levkemije

*Karla Renner, Erik Rupnik*

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

*Karla.rener@kclj.si*

### Uvod

Leta 2022 smo prejeli prve kardiološko-onkološke smernice, ki celostno obravnavajo klinični pristop k onkološkemu bolniku. Kardiotoksičnost, ki je posledica onkoloških terapij, namreč pomembno vpliva na uspešnost celotnega zdravljenja. Zaradi neenotnosti definicij kot tudi pomanjkanja raziskav s tega področja so bile smernice oblikovane predvsem na podlagi konsenza strokovnjakov, ki so prihajali iz Evropskega združenja za kardiologijo, Evropskega združenja za radioterapijo in onkologijo ter Mednarodnega združenja za kardio-onkologijo. Namen priporočil je bil strniti v en dokument to široko področje, jasno definirati srčno žilno prizadetost povezano z onkološko terapijo in predstaviti celostno vodenje bolnikov, še zlasti tistih, ki v zdravljenje vstopajo z že prisotnim srčno žilnim obolenjem (SŽO) oziroma, je razvoj le-tega ob onkološki terapiji zelo verjeten.

Smernice so obsežne in vsebujejo definicijo s kemoterapijo povzročene prizadetosti srčno-žilnega sistema (CTR-CVD, ang. cancer therapy - related cardiovascular toxicity), prikazujejo oceno srčno-žilnega sistema (SŽS) ob diagnozi rakave bolezni, kot tudi med onkološko terapijo in ter po zaključenem zdravljenju. Sistematično opredeljujejo koristi in tveganje zdravljenja z različnimi skupinami protirakavih terapij. Cilj integrirane obravnave med onkologi in kardiologi je v optimalnem vodenju in ohranjanju zdravja SŽS.

Na kliničnem oddelku za hematologijo v Univerzitem kliničnem centru Ljubljana redno izvajamo oceno srčno-žilnega stanja pri bolnikih z akutnimi levkemijami. Na podlagi starosti, klinične ocene, UZ srca in biokemičnih kazalcev srčne prizadetosti se odločamo o intenzivnosti kemoterapevtskega zdravljenja.

## Opredelitev srčno-žilnega tveganja ob diagnozi akutne levkemije

Potek razvoja CTR-CDV lahko zelo dinamičen in je odvisen od začetne prizadetosti ter od kasnejše izpostavitve kardiotoksičnim zdravilom. Že dolgo je znano, da določene skupine kemoterapevtikov, kot npr. antraciklini, ki se uporabljajo že več desetletij pri zdravljenju AML, okvarjajo srčno mišico in je njihov učinek povezan s kumulativnim odmerkom.

Pri oceni SŽS upoštevamo klinično oceno in rezultate opravljenih preiskav. Pri klinični oceni upoštevamo anamnezo dosedanjih zdravljenj, anamnezo srčno-žilne prizadetosti, prisotnost dejavnikov tveganja za srčno-žilno obolenje (SŽO), klinični pregled in meritve vitalnih znakov (krvni tlak, frekvenca srca, indeks telesne mase). Med preiskave za oceno SŽS sodijo pro BNP, troponin, EKG, glukoza na tešče ali HbA1c, ocena ledvičnega delovanja, lipidogram in transtorakalni UZ srca. Bolnike glede na ugotovitve uvrstimo v skupine tveganj za SŽO in sicer v nizko, srednje, visoko ali v skupino z zelo visokim tveganjem. Na drugi strani izbrana kemoterapija vpliva tako na resnost, trajanje kot obliko SŽO. Če je zelo verjetno, da bolnik utrpí kardiotoksični učinek kemoterapije, vendar blage stopnje, zdravljenja ne prekinjamo. Na drugi strani moramo terapijo prekiniti, kadar se razvije huda prizadetost srca. Tak primer je npr. poslabšanjem sistolične funkcije levega prekata <40% ob terapiji z antraciklini, ki jih uporabljamo v shemah zdravljenja AML.

Kardiotoksičnost antraciklinov je dobro poznana in povezana s kumulativnim odmerkom, ki ga ne smemo preseči. Prejem doksorubicina v odmerku  $\geq 250$  mg/m<sup>2</sup> ali ekvivalentnega drugega antraciklina je povezan z visokim tveganjem za SŽO. V tabeli 1 so navedeni ekvivalentni odmerki antraciklinov.

Tabela 1. Ekvivalentni odmerki antraciklinov

	DOKSORUBICIN	EPIRUBICIN	DAUNORUBICIN	MITOKSANTRON	IDARUBICIN
<b>Razmerje</b>	1	0.8	0.6	10.5	5
<b>Ekvivalentni odmerek</b>	100 mg/m <sup>2</sup>	125 mg/m <sup>2</sup>	167 mg/m <sup>2</sup>	9.5 mg/m <sup>2</sup>	20 mg/m <sup>2</sup>

## S kemoterapijo povzročeni srčno-žilni zapleti

V priporočilih so natančno definirani srčno-žilni zapleti; od kardiomiopatij, srčnega popuščanja, miokarditsov, prizadetosti žilja, hipertenzije, aritmij do podaljšanje QTc dobe. Definicije stopnje simptomatske in asimptomatske CRT-CVT so prikazane v tabeli 2.

Tabela 2. Razdelitev in definicija CRT-CVT

<b>S kemoterapijo povzročena okvara srca</b>		
<b>simptomatska</b>	zelo huda	inotropno zdravljenje, mehanska podpora cirkulacije, razmišljanje o presaditvi
	huda	hospitalizacija zaradi srčnega popuščanja
	zmerna	potreba po intenzivirani diuretični terapiji in uvedbi druge terapije srčnega popuščanja ambulantno
	blaga	blagi simptomi srčnega popuščanja
<b>asimptomatska</b>	huda	upad LVEF < 40% na novo
	zmerna	upad LVEF $\geq 10\%$ na EF 40-49% ali dodaten upad LVEF <10% na EF 40-49% in nov upad GLS za >15% ali nov porast v srčnih biomarkerjev
	blaga	LVEF $\geq 50\%$ in nov upad GLS >15% in/ali nov porast srčnih biomarkerjev

LVEF-ang. left ventricular ejection function, iztisni delež levega ventrikla

## Preprečevanje in spremljanje srčno-žilnih komplikacij med zdravljenjem

Pomembno je, da CRT-CVT zgodaj prepoznamo. Pri tem uporabljamo klinično oceno, meritve proBNP in troponina, predvsem pa UZ oceno srca. Ta nam da vpogled v strukturo in funkcijo srca. Kvantitativno ocenjujemo velikost, debelino sten, sistolično funkcijo obeh prekatov, morebitne segmentne motnje krčenja, diastolično funkcijo, nepravilnosti zaklopk, ocenjujemo tlak v pljučni arteriji in perikard. Veliko bolj občutljiv kazalec zgodnje okvare miokarda je GLS (ang. global longitudinal strain, globalna longitudinalna deformacija). Znižana vrednost GLS lahko pokaže prikrito okvaro miokarda še preden jo zaznamo s klasično meritvijo iztisnega deleža levega

prekata. Relativno zmanjšanje GLS za več kot 15% glede na stanje pred kemoterapijo je kazalec zgodnje okvare miokarda. Preiskava je zato v smernicah evropskega združenja za kardiologijo pri obravnavi bolnikov z rakom priporočena kot prednostna, pred klasičnimi kazalci sistolične funkcije.

Prizadetosti miokarda, ugotovljena bodisi z poslabšanjem GLS ali z že jasno znižano sistolno funkcija levega prekata, je potrebno skrbno spremljati, uvesti ustrezno kardialno terapijo in z izbiro nadaljnje onkološke terapije zmanjšati verjetnost dodatnega poslabšanja SŽO. Hkrati je pomembno spodbuditi bolnike k čim bolj zdravemu življenjskemu slogu in ustrezno zdraviti dejavnike tveganja SŽO (povišan krvni tlak, zvišane maščobe, sladkorno bolezen).

### **Prepoznavanje in zdravljenje srčne toksičnosti med zdravljenjem AML**

Pri terapiji AML se v standardnih shemah uporablja zlasti daunorubicin. Z antraciklini povzročena kardiotoksičnost je odvisna od odmerka in je kumulativni proces.

Pri bolnikih, ki imajo visoko ali zelo visoko tveganje SŽO, se svetuje redno spremljanje biomarkerjev (proBNP, troponin). Vedno je potrebno opraviti UZ srca pred začetkom kemoterapije (ocena sistolične funkcije levega prekata in GLS), 12 mesecev po zaključeni kemoterapiji oz. po 3 mesecih pri bolnikih z visokim ali zelo visokim tveganjem SŽO. UZ srca se priporoča tudi ob vsaki kumulativni prekoračitvi antraciklinov  $>250\text{mg}/\text{m}^2$  doksorubicina oz. ekvivalentnega odmerka drugega antraciklin (glej tabelo 1) Izkazalo se je, da so liposomalne oblike antraciklinov (liposomalni doksorubicin, liposomalni daunorubicin) manj toksične za srce, kar se pripisuje drugačni distribuciji zdravila. Nekatere raziskave so pokazale tudi, da neurohumoralna terapija (zavora renin-angiotenzin-aldosteronske osi) med terapijo z antraciklini zmanjša verjetnost okvare miokarda. Če ob terapiji bolnik utрпи simptomatsko kardiotoksičnost, je pogosto potrebno terapijo vsaj začasno prekiniti in uvesti terapijo srčnega popuščanja (ACE inhibitor ali sartan, beta blokator, SGLT2 inhibitor in agonist mineralokortikoidnega receptorja). V primeru nadaljevanja zdravljenja je pomembno, da se odmerek antraciklina zmanjša na najmanjši možen, lahko se preide na liposomalno obliko zdravila ali pa se sočasno aplicira dexrazoksan, ki je kardioprotektivno zdravilo. To se še posebej uporablja, pri preseženem kumulativnem odmerku doksorubicina  $>300\text{ mg}/\text{m}^2$  doksorubicina oziroma ekvivalentnega odmerka drugega antraciklina. Zdravilo se uporablja tudi v primeru ekstravazacije antraciklina. Deluje tako, da veže železo in zmanjša njegovo prisotnost v kompleksih z antraciklinom in zmanjša nastajanja močno reaktivnih kisikovih radikalov, ki se jim pripisuje odgovornost za kardiotoksično delovanje.

## Zaključek

Celostno vodenje onkoloških bolnikov postaja ob novim možnostih zdravljenja vse bolj kompleksno in interdisciplinarno. Ob uporabi kardiotoksične terapije je pomembno pravočasno odkrivanje prizadetosti srca, ustrezno zdravljenje in tudi preprečevanje poslabšanj. To lahko dosežemo le s sledenjem priporočeni obravnavi in tudi z vpeljavo dodatnih kazalcev prizadetosti srca kot je GLS, ki hitreje pokaže okvaro srčne mišice. Ohranjanje zdravja srčno-žilnega sistema je namreč ključno za kvalitetno dolgoročno preživetje bolnikov z rakom.

## Viri

1. ESC Guidelines on cardio-oncology developed in collaboration with the European Hematology Association (EHA), the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO) and the International Cardio-Oncology Society (IC-OS). *European Heart Journal* (2022) 00, 1–133; <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac244>

## Izbira starejšega bolnika primerne za alogensko PKMC, integracija bolnikovih in bolezenskih značilnosti

*Ana Bošković, Samo Zver*

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

*ana.boskovic@kclj.si*

Alogenska presaditev krvotvornih matičnih celic (aloPKMC) neredko predstavlja edino možnost ozdravitve krvnih bolezni. Zdravljenje je dolgotrajno in umrljivost vezana zanj je lahko visoka. 1-letno celokupno preživetje (OS) po aloPKMC je 72.1% in umrljivost, ki ni povezana s ponovitvijo bolezni (non-relapse mortality - NRM) je 12.2%. Dejavniki tveganja za zaplete aloPKMC so slabo splošno telesno stanje bolnika (performance status – PS), številne pridružene bolezni, višja starost, slabše sodelovanje bolnika pri zdravljenju, večje število režimov kemoterapije pred aloPKMC, neugodne citogenetske značilnosti in slabša učinkovitost predhodnega zdravljenja. O ustreznosti za zdravljenje z aloPKMC se odloča od primera do primera upoštevajoč klinično presojo tveganj in koristi vezanih na bolnika ter bolnikovih želja.

### **Bolezenske značilnosti**

Odločitev o aloPKMC mora vsebovati oceno osnovne krvne bolezni; vrsta, učinkovitost predhodnega zdravljenja ob presaditvi (popolna remisija – CR, delna remisija – PR, pozitivna minimalna rezidualna bolezen – MRD) in citogenetskih ter molekularno-genetskih značilnosti. Tako lahko ocenimo tveganje za ponovitev bolezni po aloPKMC. V večini primerov lahko s predhodnim zdravljenjem dosežemo vsaj delno remisijo, vendar pa neželeni sopojavi zdravljenja s kemoterapijo vplivajo na fizično kondicijo bolnika pred samo aloPKMC.

Indeks tveganja bolezni ("disease risk index" oz. DRI) je prognostični indeks aloPKMC, ki se osredotoča samo na bolezenske parametre. Na podlagi tega indeksa so bolniki razporejeni v 4 skupine glede na vrsto krvne bolezni in učinkovitost zdravljenja pred aloPKMC. 2-letni OS po aloPKMC je 64% za skupino z nizkim tveganjem, 51% za skupino z srednjim tveganjem, 34% za skupino z visokim tveganjem in 24% za skupino z zelo visokim tveganjem. DRI sicer v klinični praksi v Sloveniji ne uporabljamo.

### **Ocena bolnika pred aPKMC**

Predpresaditvena ocena vključuje natančno anamnezo in status, laboratorijske izvide, EKG, spirometrijo z DLCO, slikovne preiskave (rtg prsnega koša, UZ srca) in preiskave za opredelitev

stanja bolezni pred aloPKMC. Pri kliničnem statusu vključimo indeks telesne mase in oceno PS po ECOG lestvici in Karnofsky lestvici (priporočljivo je, da je kandidat za aloPKMC vsaj ECOG  $\leq 2$  in vsaj Karnofsky  $\geq 70$  za mieloablativno kondicioniranje in  $\geq 50$  za nemieloablativno kondicioniranje).

Z bolnikom in svojci se opravi natančen informativni pogovor o kratkoročnih in dolgoročnih tveganjih in koristih zdravljenja z aloPKMC. Bolniku ponudimo tudi možnost ohranitve plodnosti z zamrznitvijo jajčnih celic ali semenske tekočine. Pogovor na pobudo lečečega hematologa opravi hematolog, ki je usmerjen v zdravljenje z aloPKMC.

### **Vpliv za bolnikova vezanih dejavnikov tveganja**

Ko se odločamo o aloPKMC, upoštevamo bolnikovo fizično pripravljenost. Slednjo moramo smiselno oceniti. Posamezen dejavnik tveganja namreč avtomatično ne izključuje bolnika za aloPKMC.

Starost mora biti vključena v odločitev o aloPKMC, vendar ne sme biti edini omejitveni dejavnik. Z rastočo starostjo ( $> 65$  let) je odločitev za aloPKMC težja, tudi če sam bolnik nima očitnih pridruženih bolezni.

Starejšim bolnikom neredko ni ponujena možnost aloPKMC zaradi več sočasnih pridruženih bolezni, slabšega PS, neugodne citogenetike in večje možnosti za ponovitev bolezni. Retrospektivna raziskava CIBMTR (Center for International Bone & Marrow Transplant Research) pri bolnikih  $\geq 60$  let z akutno mieloblastno levkemijo (AML), ki so bili po prvi CR zdravljeni s še enim krogom konsolidacijskega zdravljenja vs. z aloPKMC, je pokazala višji NRM pri aloPKMC, vendar pa je bil 5-letni OS 13.8% vs. 28.6%. Celo pri bolnikih  $> 70$  let je CIBMTR študija ugotovila 2-letni OS 39%. Bolniki, ki so bili zdravljeni z aloPKMC, so bili v povprečju mlajši (srednja starost 64.2 vs. 67.9 let), vendar so imeli v večjem številu AML z visokim tveganjem (sekundarna AML, neugodna citogenetika).

Z razvojem nemieloablativnih režimov kondicioniranja (NMA) in režimov kondicioniranja z znižano intenziteto (RIC) je aloPKMC mogoča tudi pri starejših bolnikih in bolnikih z več pridruženimi boleznimi. Toksičnost je namreč manjša. Mieloablativni način kondicioniranja povzroči daljšo pancitopenijo, ki zahteva dolgo podporno zdravljenje vseh vrst krvnih celic. Medtem ko NMA povzroča krajše obdobje pancitopenije. RIC sodi nekje vmes. V primerjavi z mieloablativnim načinom kondicioniranja je pri NMA/RIC nižji NRM, vendar pa je večja možnost za ponovitev bolezni. Mieloablativni način kondicioniranja se uporablja okvirno do 55. leta starosti, medtem ko je bil NMA/RIC uporabljen pri bolnikih tudi do 75. leta, ki so bili v zelo dobri splošni kondiciji.

Starejši bolniki so zaradi slabše funkcionalne rezerve bolj podvrženi vsem zapletom aloPKMC, tudi bolezni presadka proti gostitelju (GVHD). Slednji je vezan na umrljivost in močno vpliva na



popresaditveno kvaliteto življenja. Incidenca GVHD je večja pri mieloabativnem režimu kondicioniranja in v primeru HLA-neskladnega nesorodnega darovalca.

V EBMT (European Society for Blood and Marrow Transplantation) retrospektivni raziskavi registra 1333 bolnikov s sekundarno AML ali mielodisplastičnim sindromom (MDS) starih  $\geq 50$  let, ki so bili zdravljeni z aloPKMC je bil v starostnih skupinah 50 do 60 let vs. nad 60 let 4-letni OS 34% vs. 27% in 4-letni NRM 36% vs. 39%. Tudi druge študije s strani CIBMTR podpirajo tezo, da je aloPKMC pri starejših bolnikih izvedljiva možnost zdravljenja.

Pridružene bolezni so pomemben dejavnik pri odločanju o zdravljenju z aloPKMC. Nemalokrat omogočajo tudi prilagoditev zdravljenja na način, ki zmanjša nadaljnje toksične učinke na slabo delujoč organ.

V predpresaditvenem obdobju imamo na voljo več orodji za oceno NRM in OS. To so mEBMT lestvica ocene tveganja, HCT-CI lestvica ocene tveganja (Hematopoietic Cell Transplantation-Specific Comorbidity Index) ipd. Ocena tveganja po **mEBMT** lestvici vključuje štiri kategorije; starost, učinkovitost zdravljenja pred aloPKMC, histokompatibilnost darovalca in prejemnika ter spol darovalca in prejemnika. Prvotno je bila mišljena za bolnike s kronično mieloično levkemijo (KML), vendar so jo kasneje razširili še na druge krvne bolezni. **HCT-CI** lestvica ocene tveganja vključuje le bolnikove pridružene bolezni in predhodna rakava obolenja. Bolniki so razporejeni v tri skupine; z nizkim tveganjem (0 točk), s srednjim tveganjem (1-2 točki) in z visokim tveganjem ( $\geq 3$  točke). 2-letni NRM v skupini z nizkim, srednjim in visokim tveganjem je 14%, 21% in 41% in 2-letni OS 71%, 60% in 34%.

Vsaka posamezna lestvica ocene tveganja je slab napovedni dejavnik OS. V raziskavah kombinacij lestvic se je kot napovednik za OS najbolj izkazala uporaba HCT-CI skupaj z DRI.

Stanje bolnika, vezano za okužbe, preverimo pred samo aloPKMC. Bolnik pred aloPKMC ne sme prebolevati aktivnih okužb. Seropozitivnost na določene infekcijske bolezni (hepatitis A, B, C, HIV, tuberkuloza) ni izključitveni dejavnik bolnika za aloPKMC, vendar pa je potrebno vedeti stadij infekcijske bolezni pred aloPKMC.

Pomemben je tudi prehranski status in telesna teža, saj imajo podhranjeni in prekomerno hranjeni bolniki več zapletov aloPKMC. Prav tako je distribucija in farmakokinetika zdravil različna.

### **Psihosocialni in socioekonomski vidik**

Pred aloPKMC opravimo psihološko oceno bolnika. Preverimo tudi, kakšno podporno strukturo ima bolnik doma in se pogovorimo s svojci, ki mu bodo morali biti v oporo. Slab socioekonomski status negativno vpliva na uspeh aloPKMC, saj je pogosteje povezan z slabšimi bivalnimi pogoji, ki

lahko predstavljajo tveganje za okužbo pri imunokompromitiranih bolnikih po aloPKMC. Prav tako imajo bolniki s slabšim socioekonomskim statusom pogosto slabši PS in več pridruženih bolezni.

### Zaključek

Z napredkom shem priprave na aloPKMC, alternativnih virov darovalcev (npr. haploidentična aloPKMC) in vse boljše popresaditvene nege in oskrbe lahko aloPKMC ponudimo tudi starejšim bolnikom in bolnikom s pridruženimi boleznimi. Glede na CIBMTR bazo podatkov je bilo v ZDA leta 2019 skupno 41% aloPKMC opravljenih pri bolnikih  $\geq 60$  let in 10% pri bolnikih  $\geq 70$  let. Kljub vse večjemu številu presajenih starejših bolnikov pa je dejstvo, da se večina krvnih bolezni, ki jih zdravimo z aloPKMC pojavlja pri še starejši populaciji kot je opisana v navedenih kliničnih raziskavah. Srednja starost ob diagnozi AML je namreč 68 let in pri bolnikih starejših od 65 let je 5-letni OS  $< 5\%$ . Odločanje glede pristopa k zdravljenju starejših bolnikov je težko. Potrebne so nadaljnje raziskave, da bomo lahko varneje in z večjo gotovostjo napotili starejše bolnike na aloPKMC.

### Viri

1. Lipof JJ, Loh KP, O'Dwyer K, Liesveld JL. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Older Adults with Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2018 Jun 4;10(6):179.
2. Lin RJ, Artz AS. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for older patients. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2021 Dec 10;2021(1):254-263.
3. Armand P, Kim HT, Logan BR, Wang Z, Alyea EP, et al. Validation and refinement of the Disease Risk Index for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2014 Jun 5;123(23):3664-71.
4. Michelis FV, Messner HA, Uhm J, Alam N, Lambie A, et al. Modified EBMT Pretransplant Risk Score Can Identify Favorable-risk Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for AML, Not Identified by the HCT-CI Score. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015 May;15(5):e73-81.

# MIELOPROLIFERATIVNE BOLEZNI (ZHS)

Izbira zdravila pri pravi policitemiji – interferon ali ruksolitinib

*Biljana Todorova<sup>1</sup>, Nejc Pulko<sup>2</sup>*

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

*2 Oddelek za hematologijo in hematološko onkologijo, UKC Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor*

*nejc.pulko@ukc-mb.si*

## Uvod

Policitemija vera je kronična, napredujoča mieloproliferativna novotvorba, ki je povezana s prisotnostjo mutacije JAK2 (ekson 14 ali 12). Mutacija povzroči aktivacijo znotrajcelične signalne poti JAK/STAT. Incidenca bolezni je ocenjena na 1,9/100 000, z mediano starosti 60 let, desetina bolnikov je mlajših od 40 let.

Za bolezen je značilno povečano število eritrocitov, lahko pa tudi trombocitov in levkocitov. Bolniki lahko imajo povečano vranico, pogosto so prisotni tudi B simptomi (hujšanje, nočno potenje, nenamerna izguba telesne teže, povišana telesna temperatura) in srbečica kože. Bolezen je povezana z nižjo kvaliteto življenja, večjo pojavnostjo tromboemboličnih zapletov in nevarnostjo za napredovanje v mielofibrozo ali akutno levkemijo. Zdravljenje je usmerjeno v zmanjševanje tveganja za tromboembolične dogodke in simptomov bolezni.

Odločitev o zdravljenju prave policitemije pri bolniku je odvisna od tveganja za trombozo. Bolnike izhodno zdravimo z venepunkcijami in acetilsalicilno kislino. Ciljne vrednosti hematokrita so pod 45 % pri moških in pod 42 % pri ženskah.

Dodatno citoreduktivno zdravljenje potrebujejo bolniki starejši od 60 let, bolniki s predhodnim trombotičnim dogodkom in bolniki, ki izpolnjujejo enega od kriterijev:

- neprenašanje venepunkcij,
- nezadostna kontrola hematokrita z venepunkcijami,
- progresivna simptomatska splenomegalija,
- vztrajajoča levkocitoza ( $> 15 \times 10^9/L$ ),

- napredujoča levkocitoza (podvojitve vrednosti ob  $L > 10 \times 10^9/L$ , ali 50 % povečanje ob vrednosti levkocitov  $> 10 \times 10^9/L$ ),
- visoka trombocitoza ( $> 1500 \times 10^9/L$ ),
- visoko tveganje za kardiovaskularne dogodke,
- izraziti simptomi bolezni.

Citoreduktivna terapija izbora v prvi liniji je hidroksiurea. V drugi liniji se odločamo med zdravljenjem z interferonom alfa in ruksolitinibom.

### Zdravljenje z interferonom alfa

Interferoni so citokini z imunomodulatornimi značilnostmi. Zadnji izsledki raziskav kažejo, da zdravljenje z interferonom alfa vpliva na aktivnost krvotvornih matičnih celic.

Interferon alfa je lahko terapija izbora v drugi liniji zdravljenja in omogoča dober nadzor nad eritrocitozo in trombocitozo pri približno 80 % bolnikov s policitemijo vero. Pri 5-10% bolnikov je dodatno opisano tudi zmanjšanje alelnega bremena, kar za druge terapije ni bilo dokazano.

Terapija učinkovito vpliva na zmanjšanje B simptomov in srbečice ter s tem izboljša kvaliteto življenja bolnikov. Hematološki odgovor pri zdravljenju z interferonom se, za razliko od zdravljenja s hidroksiureo, s časom zdravljenja pogloblja.

Pegilirani interferon ima manj neželenih stranskih učinkov v primerjavi s standardnim interferonom, vendar ga nekateri bolniki še vedno slabše prenašajo. Pegilirane oblike interferona imajo podaljšano razpolovno dobo in omogočajo redkejše aplikacije.

V PROUD-PV študiji so primerjali zdravljenje s pegiliranim interferonom alfa in hidroksiureo v obdobju 3 let. Zgolj 8 % bolnikov je prenehalo s terapijo zaradi neprenašanja zdravila. Raziskave prenašanja terapije iz kliničnega okolja poročajo slabše podatke, do 30 % bolnikov preneha zdravljenje zaradi vročine, bolečin v mišicah in kosteh, slabosti ali bruhanja. V primerjavi s hidroksiureo ima interferon tudi več neželenih učinkov stopnje 3 in 4. Zraven hematološke toksičnosti moramo biti posebej pozorni na nevropsihiatrični vpliv (poglabljanje depresije), hepatopatijo in avtoimune zaplete (hipotiroidizem, hepatitis, vaskulitis).

Zdravljenje z interferonom ima trenutno mesto pri bolnikih, mlajših od 40 let in nosečnicah, ki potrebujejo citoreduktivno zdravljenje ter v drugi liniji zdravljenja.

## **Vloga interferona alfa v prvi liniji zdravljenja bolnikov z malim tveganjem za trombembolične dogodke**

Vse bolj se preiskujejo možnosti uvajanja zdravljenja z interferonom alfa pri bolnikih z nizkim tveganjem. Barburi et al. so v študiji Low-PV preiskovali učinkovitost zdravljenja z pegiliranim interferonom alfa v primerjavi z venepunkcijami pri bolnikih s policitemijo vero z malim tveganjem. Po enem letu terapije je 84 % bolnikov zdravljenih s pegiliranim interferonom doseglo ustrezno znižanje hematokrita v primerjavi z 60 % bolnikov v kontrolni skupini. Bolniki v preiskovalni skupini so imeli tudi nižje vrednosti levkocitov, trombocitov, uspešnejše zmanjšanje velikosti vranice in zmanjšanje JAK2 V617F alelnega bremena. Varnostni profil pegiliranega interferona alfa je bil ugoden. Bolniki, ki so prejeli citoreduktivno terapijo, so navajali izboljšanje kvalitete življenja. Zaradi kratkega trajanja študije ni dokazov o zmanjšanem tveganju za trombotične dogodke. Zdravljenje z interferonom v prvi liniji prinaša kratkotrajne prednosti v primerjavi s hidroksiureo. Hkrati moramo upoštevati varnostni profil in stranske učinke terapije ter stroške zdravljenja z interferonom. Potrebne bodo dodatne preiskave, ki bodo natančneje pojasnile vpliv terapije z interferonom na tveganje za prehod v mielofibrozo, zmanjšanje trombotičnih dogodkov in izboljšanje kvalitete življenja.

## **Zdravljenje z ruksolitinibom**

Ruksolitinib je selektivni zaviralec JAK in pri bolnikih s policitemijo vero utiša hipersenzitivnost krvotvorne matične celice. RESPONSE študija je preiskovala ruksolitinib v drugi liniji zdravljenja PV. Ruksolitinib je primerjala z najboljšo alternativno terapijo (interferon alfa ali pegiliran interferon alfa, anagrelid ali opazovanje). Potrebno je poudariti, da je zgolj 14 % bolnikov v kontrolni skupini prejelo interferon alfa ali pegiliran interferon alfa. Ruksolitinib je zmanjšal potrebo po venepunkcijah (zgolj še 20 % bolnikov) in velikost vranice pri več kot tretjini bolnikov. Pri polovici bolnikov je prišlo do zmanjšanja simptomov bolezni. V prvih 6 mesecih opazovanja je bilo manj tromboemboličnih dogodkov. Največje izboljšanje kvalitete življenja so poročali bolniki s simptomatsko splenomegalijo in srbečico.

Večina bolnikov je terapijo dobro prenašala, saj jih je 83 % ostalo na terapiji ves čas opazovanja (80 tednov). Ob hematološki toksičnosti so imeli bolniki več herpes zoster okužb in večjo pojavnost kožnega raka.

Za zdravljenje policitemije vere z ruksolitinibom se odločimo v drugi liniji zdravljenja pri bolnikih s simptomatsko splenomegalijo, izrazito srbečico ali ob napredovanju v mielofibrozo.

## Zaključek

Zdravljenje je usmerjeno v zmanjševanje tveganja za tromboembolične dogodke in simptomov bolezni. Bolnike z nizkim tveganjem zdravimo z venepunkcijami in acetilsalicilno kislino. V primeru potrebe po citoreduktivnem zdravljenju se v prvi liniji odločimo za hidroksiureo. Zdravljenje z interferonom ima trenutno mesto pri mlajših od 40 let in nosečnicah, ki potrebujejo citoreduktivno zdravljenje ali v drugi liniji zdravljenja. V drugi liniji zdravljenja se za ruksolitinib odločimo pri bolnikih s simptomatsko splenomegalijo, izrazito srbečico ali ob napredovanju v mielofibrozo.

## Viri

1. Marchetti M, Vannucchi AM, Griesshammer M, Harrison C, Koschmieder S, Gisslinger H, et al. Appropriate management of polycythaemia vera with cytoreductive drug therapy: European LeukemiaNet 2021 recommendations. *Lancet Haematol.* 2022;9(4):e301-11.
2. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2020;95(12):1599-613.
3. How J, Hobbs G. Interferons as the First Choice of Cytoreduction in Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera. *J Natl Compr Canc Netw.* 2022;20(9):1063-68.
4. Tefferi A. Prognosis and treatment of polycythemia vera and secondary polycythemia [internet]. UpToDate; 2023. Dosegljivo 20.03.2023 na URL: [www.uptodate.com/contents/prognosis-and-treatment-of-polycythemia-vera-and-secondary-polycythemia](http://www.uptodate.com/contents/prognosis-and-treatment-of-polycythemia-vera-and-secondary-polycythemia)
5. Barbui T, Vannucchi AM, De Stefano V, Masciulli A, Carobbio A, Ferrari A et al. Ropeginterferon alfa-2b versus phlebotomy in low-risk patients with polycythaemia vera (Low-PV study): a multicentre, randomised phase 2 trial. *Lancet Haematol.* 2021;8(3):e175-84.
6. Tefferi A, Vannucchi AM, Barbui T. Polycythemia vera: historical oversights, diagnostic details, and therapeutic views. *Leukemia.* 2021;35(12):3339-51.

## Diagnostika in zdravljenje primarne mielofibroze

*Nataša Fikfak, Peter Vičič*

*Splošna bolnišnica „dr. Franca Derganca“ Nova Gorica*

*natasa.fikfak@bolnisnica-go.si, peter.vicic@bolnisnica-go.si*

### **Opredelitev**

Primarna mielofibroza (PMF) je ena izmed kroničnih mieloproliferativnih neoplazem, kamor uvrščamo še pravo policitemijo (PRV), esencialno trombocitozo (ET), kronično mieloično levkemijo (KML), kronično eozinofilno levkemijo, kronično nevtrofilno levkemijo in neopredeljene kronične mieloproliferativne neoplazme (MPN), ki jih na podlagi diagnostičnih meril ne moremo uvrstiti v nobeno izmed omenjenih entitet (klasifikacija WHO 2016).

Za PMF večinoma zbolevaro starejši, bolezen je pred 50 letom starosti redka, mediana starost ob postavitvi diagnoze znaša 67 let. Značilna je klonska proliferacija celic mieloične vrste, katerih dozorevanje in funkcionalnost vsaj v začetni fazi bolezni sicer nista izraziteje motena (za razliko od mielodisplastičnih sindromov), sta pa tako displazija kot disfunkcija s trajanjem bolezni napredujoča. Značilno je kopičenje vezivnega tkiva v krvotvornem kostnem mozgu, zaradi česar hematopoetsko funkcijo prevzamejo drugi organi – predvsem vranica in jetra, lahko pa se otočki krvotvornega tkiva pojavijo praktično kjerkoli v telesu. Naravni potek bolezni vodi od praktično brezsimptomnega stanja do postopnega razvoja klasične klinične slike, ki je posledica ekstramedularne hematopoeze in odpovedovanja kostnega mozga s posledičnimi citopenijami. V obdobju napredovanja bolezni ali ob transformaciji bolezni v akutno mieloično levkemijo (AML) se pojavijo simptomi hipermetabolnega stanja. Transformacija v AML, ki se sicer pojavi pri majhnem deležu bolnikov, je poleg okužb, trombemboličnih zapletov in krvavitev glavni vzrok smrti.

Način zdravljenja je odvisen od izraženosti simptomov, sočasnih bolezni, starosti bolnika in ocene tveganja za napredovanje bolezni in transformacijo v AML. Bolnike lahko zgolj klinično in laboratorijsko spremljamo, zdravimo s hidrokisuro, JAK inhibitorji (ruksolitinib), danazolom, eritropoetini, transfuzijami koncentriranih eritrocitov. Redko pride v poštev kirurška splenektomija ali radioterapija vranice. Za zdaj edina ozdravitvena terapija je alogenska presaditev krvotvornih matičnih celic (aloPKMC).

## Diagnostika

Diagnozo postavimo na podlagi klinične slike, laboratorijskih preiskav periferne krvi (krvna slika, osnovna biokemija, molekularno genetske preiskave) in preiskav kostnega mozga ob upoštevanju kliničnih kriterijev (tabela 1). Slikovne preiskave niso specifične in ne nudijo dodatnih informacij, ki bi kakorkoli vplivale na postavitve diagnoze, zato ne spadajo v diagnostični algoritem.

## Klinična slika

- splošni simptomi: utrujenost, izguba telesne teže, blago zvišana telesna temperatura, nočno znojenje, srbečica

- simptomi ekstramedularne hematopoeze:

- izrazita splenomegalija s tiščanjem v zgornjem delu trebuha, hitro sitostjo in inapetenco, lahko bolečine ob infarktu ali rupturi vranice
- hepatomegalija, ob napredovanju razvoj portalne hipertenzije z vsemi znanimi posledicami
- kostne bolečine zaradi osteoskleroze in periostitisa (predvsem vretenca, rebra, dolge kosti okončin), sklepne bolečine ob sekundarnem protinu
- hemoptize in dispneja pri hematopoezi v pljučih in pljučni hipertenziji

- simptomi anemije: utrujenost, zadihanost, bledica, palpitacije, tahikardija

- tromboembolični zapleti: običajno venske tromboze, pogosto v splanhničnem žilju (portalna tromboza)

## Laboratorijski izvidi

- anemija, običajno normocitna, zmerne do hude stopnje (značilna je anizocitoza, dakriociti in nezreli eritrociti v periferni krvi, polikromazija)

- lahko levkocitoza (nevtrofilija) in trombocitoza ali levkopenija in trombocitopenija, levkoeritroblastna krvna slika s pomikom v levo do blastne celice

-povečana aktivnost alkalne fosfataze, LDH, povišana koncentracija sečne kisline in vitamina B12, patološki jetrni testi



- citogenetske preiskave: niso potrebne za postavitve diagnoze, so pa v pomoč pri prognozi
- molekularna genetika: mutacije JAK2 V617F (60-65% bolnikov), CALR (20-25% bolnikov), MPL (5% bolnikov), 8-10% bolnikov »trojno negativnih«, drugi monoklonalski markerji ( *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*)

### Preiskave kostnega mozga

- citološka punkcija je običajno suha
- biopsija je obvezna (prikaz fibroze z barvanjem na retikulin, ekspanzija sinusoidov kostnega mozga z osteosklerozo, znotrajžilna hematopoeza, atipična megakariocitna hiperplazija, v posameznih primerih celularne faze PMF izrazita hiperplazija kostnega mozga z le malo fibroze)

### Prognostični pomen citogenetskih preiskav

- visoko tveganje: del7, i(17q), inv(3)/3q21, 12p-/12p11.2, 11q-/11q23, vse trisomije (npr. +8/+9/+21/+19)
- srednje tveganje: vse ostale nenormalnosti
- nizko tveganje: normalen kariotip, izolirane nepravilnosti +9, 13q-, 20q-, translokacije/duplikacije na kromosomu 1, nepravilnosti spolnih kromosomov vključno z izgubo y

### Mutacije z velikim tveganjem

- ASXL1 (38% bolnikov)
- SRSF2 (14% bolnikov)
- U2AF1Q157 (8% bolnikov)
- EZH2 (7% bolnikov)
- IDH1/2 (4% bolnikov)

TABELA 1: DIAGNOSTIČNI KRITERIJI (WHO 2016) – ločimo polno izraženo PMF in pre-PMF

---

**MAJOR KRITERIJI - PMF**

1. proliferacija in atipija megakariocitov s fibrozo gradusa 2 ali 3
2. ni kriterijev za PRV, ET, BCR/ABL KML, MDS ali druge mieloične neoplazme
3. mutacija JAK2, CALR, MPL ali drug monoklonski marker (*ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1*) in izključena reaktivna mielofibroza

**MINOR KRITERIJI - PMF (prisoten vsaj 1 ob dveh zaporednih pregledih)**

1. anemija brez drugega vzroka
2. levkocitoza  $>11 \times 10^9/L$
3. tipna splenomegalija
4. povišana aktivnost LDH
5. levkoeritroblastna krvna slika

ZA POSTAVITEV DIAGNOZE: vsi trije major + vsaj en minor kriterij

---

---

**MAJOR KRITERIJI - pre-PMF**

1. proliferacija in atipija megakariocitov s fibrozo gradusa  $>1$ , povečana celularnost kostnega mozga z granulocitno proliferacijo in pogosto zavrto eritropoezo
2. ni kriterijev za PRV, ET, BCR/ABL KML, MDS ali druge mieloične neoplazme
3. mutacija JAK2, CALR, MPL ali drug monoklonski marker (*ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1*) in izključena reaktivna mielofibroza

**MINOR KRITERIJI - pre-PMF (prisoten vsaj 1 ob dveh zaporednih pregledih)**

1. anemija brez drugega vzroka
2. levkocitoza  $>11 \times 10^9/L$
3. tipna splenomegalija
4. povišana aktivnost LDH

ZA POSTAVITEV DIAGNOZE: vsi trije major + vsaj en minor kriterij

---

## Diferencialna diagnoza

PMF moramo predvsem ločiti od drugih mieloproliferativnih bolezni, pri katerih v kostnem mozgu lahko naletimo na precej fibroze – PRV, ET, KML, MDS, mastocitoze, kronične mielomonocitne levkemije. Fibroza kostnega mozga lahko spremlja levkemijo dlakastih celic, limfome, plazmocitom, metastaze solidnih tumorjev v kosti, nekatere imunsko pogojene bolezni (sistemski lupus eritematosus, sistemsko sklerozo, polimiozitis, mešano vezivnotkivno bolezen), primarno pljučno hipertenzijo, ledvično osteodistrofijo. Mielofibrozi identična klinična slika se lahko razvije pri bolnikih s predhodno znano PRV ali ET, kar imenujemo sekundarna mielofibroza.

## Zdravljenje

Na način zdravljenja vplivajo značilnosti bolezni in značilnosti bolnika. PMF je v večini primerov bolezen starejše populacije, pri kateri agresivna kemoterapija in presaditev krvotvornih matičnih celic nista primerni. Običajno so to bolniki s pridruženimi kroničnimi boleznimi (predvsem srčno-žilna obolenja, kronična ledvična bolezen) in splošno telesno krhkostjo, kar moramo upoštevati in izbrati čim manj toksično, predvsem v simptome bolezni usmerjeno zdravljenje. Uporabljamo citoreduktivno terapijo s hidrokisuro, predvsem ob simptomatski splenomegaliji JAK inhibitorje, ob simptomatski anemiji zdravimo podporno s transfuzijami koncentriranih eritrocitov, kortikosteroidi, eritropoetini. Potrebno je preprečevanje tromboemboličnih dogodkov. Obsevanje oziroma kirurška odstranitev vranice lahko nudita vsaj začasno olajšanje simptomov, vendar se ju po prihodu JAK inhibitorjev v vsakdanjo klinično prakso praktično ne poslužujemo več. Z odstranitvijo vranice tudi tvegamo poslabšanje anemije in večjo odvisnost od zdravljenja s transfuzijami eritrocitov, saj vranica običajno predstavlja glavno mesto ekstramedularne hematopoeze. Na samo preživetje zdravljenje z zdravili nima pomembnega vpliva, se pa lahko bistveno izboljšajo simptomi bolezni in s tem kakovost bolnikovega življenja. Pogosto se pri bolnikih, ki nimajo motečih simptomov oziroma izrazite klinične slike odločimo za klinično in laboratorijsko spremljanje brez zdravljenja.

Edini način zdravljenja, ki nudi možnost ozdravitve, je aloPKMC, kar pa seveda spremljajo možni življenjske ogrožujoči zapleti v času presaditve in v letih po njej. Za presaditev so primerni mlajši bolniki brez pomembnih pridruženih kroničnih bolezni, pri odločitvi si lahko pomagamo tudi z oceno prognoze bolezni in s tem tveganja za hitro napredovanje in prehod v akutno levkemijo. V uporabi je več točkovnikov za oceno tveganja – GIPPS (genetically-inspired prognostic scoring system), MIPSSv2 (mutation- and karyotype-enhanced international prognostic scoring system), ki poleg citogenetskih značilnosti upošteva tudi nekatere klinične kazalnike in DIPSS, ki je

popolnoma kliničen in ga lahko uporabimo, če nimamo na voljo citogenetskih in molekularnogenetskih preiskav. Omenjeni točkovniki so prosto dostopni na medmrežju.

#### Viri.

1. Marco Pizzi, Giorgio Alberto Croci, Marco Ruggeri, Silvia Tabano, Angelo Paolo Dei Tos, Elena Sabbatini, Umberto Gianelli. The Classification of Myeloproliferative Neoplasms: Rationale, Historical Background and Future Perspectives with Focus on Unclassifiable Cases. *Cancers (Basel)* 2021 Nov. 12;13(22):5666, doi: 10.3390/cancers13225666. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34830822/>.
2. Aaron T Gerds, Jason Gotlib, Haris Ali, Prithviraj Bose et. al. Myeloproliferative Neoplasms, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2022 Sep;20(9):1033-1062, doi: 10.6004/jnccn.2022.0046. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36075392>.
3. Ayalew Tefferi, MD. Clinical manifestations and diagnosis of primary myelofibrosis. Dostopno na [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com) (1.3.2023).
4. Ayalew Tefferi, MD. Management of primary myelofibrosis. Dostopno na [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com) (1.3.2023).
5. Ayalew Tefferi, MD. Prognosis of primary myelofibrosis. Dostopno na [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com) (1.3.2023).
6. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2021 Jan;96(1):145-162. doi: 10.1002/ajh.26050. Epub 2020 Dec 2. PMID: 33197049. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33197049/>
7. J.P.Greer, A.A.Arber, F.R.Appelbaum et al: *Wintrobe's clinical Hematology*, 14th edition, Philadelphia, PA, Wolters Kluwer, 2019.
8. Hoffbrand A.V, Steensma D.P. et al: *Hoffbrand's essential haematology*, 8th edition, Hoboken, Wiley, 2019
9. ASH, Education Program, 61th ASH Annual Meeting and exposition, Orlando, Florida, 2019

## Vodenje primarne mielofibroze - kdaj bolnika napotiti na presaditev krvotvornih matičnih celic

Ana Čebokli, Matjaž Sever

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

anck88@gmail.com

### Uvod

Primarna mielofibroza (PMF) je po WHO klasifikaciji uvrščena v skupino Ph negativnih mieloproliferativnih novotvorb. Gre za klonsko bolezen, večinoma povezano z mutacijami v genih *JAK2*, *CALR* in *MPL*. Bolezen se navzven lahko izraža precej heterogeno. Poleg sprememb v krvni sliki, je značilna prezentacija boleznin v kostnem mozgu z različno hudo izraženo fibrozo le tega. Povzroča splošne (B) simptome, povečano vranico, ekstramedularno hematopoezo in predstavlja povečanje tveganja za napredovanje boleznin v akutno levkemijo. Ugotovitev boleznin, posebej razlikovanje med prefibrotično fazo PMF in esencialno trombocitemijo (ET) s pozitivno *CALR* mutacijo lahko predstavlja že velik izziv za patologa in klinika. Vodenje bolnika s PMF je prav tako zahtevno zaradi heterogenosti izražanja boleznin in dodatno prisotnih mutacij. Pri odločanju o posamezni vrsti zdravljenja bolnika si lahko pomagamo z različnimi prognostičnimi sistemi.

### Možnosti zdravljenja PMF

Ob ugotovitvi PMF si pri nadaljnjem odločanju o zdravljenju pomagamo lahko z več dostopnimi mednarodnimi prognostičnimi točkovniki, ki v grobem razdelijo bolnike s PMF v skupine z nizkim, srednjim (intermediate -1 in 2) in visokim oz. zelo visokim tveganjem. Po literaturi se zaenkrat največ uporablja DIPSS plus točkovnik (Dynamic International Prognostic Scoring System – plus), ki se ga lahko poslužujemo v katerikoli fazi boleznin in ne le ob ugotovitvi boleznin (D – dynamic oz. dinamični točkovnik). DIPSS plus kot spremenljivke, ki vplivajo na prognozo boleznin upošteva bolnikovo starost, raven hemoglobina, število levkocitov, delež blastov v venski krvi, B simptome, transfuzijsko odvisnost, število trombocitov in prisotnost dodatnih neugodnih sprememb v kariotipu. Z dodatnim poznavanjem in opredelitve dodatnih neugodnih mutacij, ki jih lahko dokažemo z NGS (sekveniranje naslednje generacije) so se pojavili novi prognostični sistemi, zadnji v vrsti je MIPSS70 plus, različica 2.0, ki upošteva genetske in klinične spremenljivke boleznin. MIPSS70 plus različica 2.0 se uporablja pri bolnikih, mlajših od 70 let, ki so kandidati za alogensko

presaditev kostnega mozga. Obstaja pa tudi točkovnik GIPSS, ki upošteva le genetske spremenljivke bolezni. Vsi omenjeni prognostični sistemi so napravljeni na bolnikih s primarno mielofibrozo. Za napoved poteka bolezni pri bolnikih s sekundarno mielofibrozo po pravi policitemiji ali esencialni trombocitemiji pa uporabljamo prognostični točkovnik MYSEC-PM, ki razvrsti bolnike v štiri prognostične skupine s podobnimi posledicami za obravnavo kot pri primarni MF.

Mutacije v genih *JAK2*, *CALR* in *MPL* se štejejo kot vodilne (driver) mutacije in so prisotne v več kot 90% pri bolnikih s PMF. Trojno negativni bolniki imajo prognostično slabšo napoved poteka bolezni. Pri obeh skupinah je prognostično pomembna tudi prisotnost dodatnih mutacij (non-driver) in njihovo število: *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, in *IDH1/IDH2*.

Glede na uvrstitev bolnika v različne prognostične skupine, se odločamo za uvedbo zdravljenja. In sicer izbiramo med spremljanjem bolezni, citoreduktivnim zdravljenjem, zdravljenjem z inhibitorji *JAK2* (predvsem ruksolitinib), simptomatskim zdravljenjem z nadomeščanjem krvnih komponent in zdravljenjem z alogensko presaditvijo krvotvornih matičnih celic (alo PKMC). Le zadnja zaenkrat zagotavlja možnost ozdravitve bolezni, vendar pa je povezana z mnogimi zapleti in ni primerna za bolnike nad starostjo 70 let (ki pa ni absolutna meja, odločamo se individualno).

### **Napotitev na alogensko PKMC**

Bolniki, ki se uvrstijo v prognostično srednjo skupino 2 (intermediate 2) in visoko rizično skupino, imajo mediano preživetje manj kot 5 let po ugotovitvi bolezni in so kandidati za zdravljenje z alogensko PKMC. Bolniki z nizkim tveganjem ob nastopu bolezni niso kandidatni za alogensko presaditev kostnega mozga, saj je mediana preživetja teh bolnikov več kot deset let. Izziv predstavljajo bolniki v skupini intermediate 1, še posebej mlajši. V teh primerih je odločitev o zdravljenju z alogensko PKMC individualizirana. Potrebno je upoštevati še način življenja, simptome bolezni in nenazadnje tudi dostopnost sorodnega darovalca kostnega mozga (KM).

Izbira časovnice zdravljenja z alogensko PKMC ostaja eden večjih izzivov. Prezgodnje zdravljenje z alogensko PKMC in s tem povezano toksičnostjo se je statistično odrazilo s povišano prezgodnjo umrljivostjo. Medtem ko predolgo odlaganje zdravljenja z alogensko PKMC vodi v večjo smrtnost zaradi višje starosti bolnika ali zapletov povezanih z napredujočo boleznijo.

### **Zdravljenje pred presaditvijo**

Trenutno se priporoča zdravljenje z ruksolitinibom pred alogensko PKMC pri bolnikih s splošnimi simptomi in povečano vranico. Glede na raziskave, je odgovor na zdravljenje z ruksolitinibom povezan z boljšim preživetjem bolnikov po alogenski PKMC. Pri teh so zaznali, da je celokupno preživetje 2 leti po alogenski PKMC 91%, napram 32% pri tistih, pri katerih ni bilo odgovora na

zdravljenje z ruksolitinihom, ali je celo med zdravljenjem prišlo do progressa bolezni. Trenutno se glede na raziskave priporoča, da se zdravljenje z ruksolitinihom vzdržuje vse do začetka kondicioniranja pred presaditvijo. Med kondicioniranjem se ruksolitinih postopno ukinja v padajočih odmerkih, v izogib zapletom, kot so odtegnitvena reakcija in povečana verjetnost okužb, predvsem virusnih.

Nadaljevanje zdravljenja z ruksolitinihom po alogenski PKMC se večinoma ne priporoča, saj zvišuje tveganje za reaktivacijo citomegalovirusa (CMV) in druge virusne okužbe. Priporoča se le v kontekstu relapsa bolezni zaradi zmanjševanja simptomov bolezni ali zdravljenja reakcije presadka proti gostitelju (GvHD). V preteklosti se je priporočala še splenektomija pred alogensko PKMC ali obsevanje vranice. Predvsem splenektomija se ne izvaja več, zaradi več periproceduralnih zapletov z visoko umrljivostjo. Sicer je glede na raziskave pri splenektomiranih bolnikih prišlo do hitrejšega vgnezdjenja matičnih celic (engraftment), vendar pa so zaznali tudi več relapsov bolezni.

### **Alogenska PKMC pri bolnikih z PMF**

Odločamo se za mieloablativno in nemieloablativno kondicioniranje, na izbiro le tega pa vpliva starost bolnika in njegov klinični status, pridružene bolezni. Glede na dostopnega darovalca (sorodni in nesorodni) se odločamo še o preprečevanju reakcije presadka proti gostitelju z antitimocitnim globulinom.

### **Faktorji, ki vplivajo na izhod zdravljenja PMF po alogenski PKMC**

- Starost bolnika: starost sama po sebi ni omejujoči dejavnik, možna je izbira manj toksičnega, nemieloablativnega kondicioniranja. Odločamo se glede na status zmogljivosti bolnika in pridružene bolezni.
- Mutacijski status bolezni: prisotnost *CALR* mutacije je prognostično ugodna, medtem ko pri *JAK* mutaciji ni čisto jasen vpliv na izhod zdravljenja. Predvideva se da je »divji tip« *JAK-2* prognostično neugoden.
- Gradus fibroze KM: Izkazalo se je, da ne vpliva na izhod zdravljenja. Predstavlja celo indikator uspešnosti zdravljenja. Bolniki, ki so prej dosegli zmanjšanje fibroze kostnega mozga po alogenski PKMC imajo boljši izhod zdravljenja in manjšo verjetnost ponovitve bolezni.
- Vrsta darovalca: še vedno velja, da je preživetje po sorodni alogenski PKMC boljše kot pri nesorodni alogenski PKMC, vendar se je z optimizacijo kondicioniranja, GvHD profilakse in boljšim podpornim zdravljenjem tudi nesorodna alogenska PKMC po varnosti približala

sorodni alogenski PKMC, kar so potrdile tudi primerjalne raziskave med obdobjema v letih od 2000 - 2010 in 2011-2014.

- Vir matičnih celic: raziskave niso potrdile pomembnih razlik med presadki pridobljenimi z aferezo periferne krvi ali presadki iz kostnega mozga. Je pa višja verjetnost vgnezditev pri alogenski PKMC s presadki, pridobljenimi z aferezo. Alogenska PKMC s presadki pridobljenimi iz umbilikalne krvi se odsvetujejo zaradi slabše vgnezditev.

### **Levkemična transformacija PMF**

Do levkemične transformacije pri PMF pride pogosteje kot pri pravi policitemiji in esencialni trombocitemiji. Prognoza po levkemični transformaciji je slaba, mediano preživetje je 3 mesece. Dejavniki tveganja za levkemično transformacijo so prisotne neugodne kromosomske nenormalnosti, neugodne točkovne mutacije, večji delež blastov v krvi. Ključno pri zdravljenju je, da dosežemo remisijo bolezni z ustrezno kemoterapijo, ki ji sledi zdravljenje z alogensko PKMC. Le to trenutno edino omogoča dolgotrajnejše preživetje bolnikov.

### **Zaključek**

Zdravljenje primarne mielofibroze še naprej ostaja zahtevno. Zaenkrat nimamo na voljo učinkovitih zdravil, s katerimi bi lahko dosegli remisijo bolezni. Edino možnost ozdravitve predstavlja alogenska PKMC, ki pa v skupini bolnikov s PMF z nizkim in nizkim srednjim tveganjem ne odtehta povečanega tveganja smrtnosti zaradi zdravljenja z alogensko PKMC. V nasprotju s prepričanji izpred let, starost bolnika ne predstavlja več najpomembnejšega omejitvenega dejavnika in na alogensko PKMC lahko napotimo bolnike do starosti 70 let, izjemoma tudi starejše. Odločitev o zdravljenju z alogensko PKMC je za vsakega bolnika individualizirana. Pri odločitvi si pomagamo s kombinacijo prognostičnih sistemov, statusa zmogljivosti bolnika, pridruženimi boleznimi, upoštevamo pa tudi želje bolnikov.



## Viri

1. Khoury, J.D., Solary, E., Abla, O. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 36, 1703–1719 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>
2. B. Garmezzy, J. K. Schaefer, J. Mercer, et.al. A provider's guide to primary myelofibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Blood Reviews*, Vol. 45, (2021) <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100691>.
3. F.Wang, T.Qiu, H. Wang, et.al. State of the art review on Myelofibrosis therapies. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 350-362 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.clml.2021.11.007>
4. Zhang L, Yang F, Feng S. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for myelofibrosis. *Ther Adv Hematol*. 2020 Feb 13;11:2040620720906002. doi: 10.1177/2040620720906002. PMID: 32110286; PMCID: PMC7019406.
5. Jain T, Mesa RA, Palmer JM. Allogeneic Stem Cell Transplantation in Myelofibrosis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017 Sep;23(9):1429-1436. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.05.007. Epub 2017 May 10. PMID: 28499938; PMCID: PMC8148877.
6. D. P. McLornan, I.Yakoub-Agha, M. Robin, et.al. State-of-the-art review: allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis in 2019. *Haematologica* 2019;104(4):659-668; <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.206151>.
7. E. Carreras, C. Dufour, M. Mohty, et.al. *The EBMT Handbook: Hematopoietic stem cell transplantation and cellular therapies* (2019), [cited 2023 Mar 19 ]. Na voljo: [https://www.ebmt.org/sites/default/files/2019-01/2019\\_Book\\_TheEBMTHandbook.pdf](https://www.ebmt.org/sites/default/files/2019-01/2019_Book_TheEBMTHandbook.pdf)

## Trombotični zapleti pri Ph-negativnih mieloproliferativnih novotvorbah

*Tajda Starman, Irena Preložnik Zupan*

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

*Tajda.starman@kclj.si*

### Uvod

Med klasične Ph-negativne mieloproliferativne novotvorbe (MPN) sodijo primarna mielofibroza (PM), esencialna trombocitemija (ET) ter prava policitemija (PV). Njihovi glavni zapleti so tromboze, krvavitve, prehod v akutno mieloično levkemijo (AML) ali fibrotično obliko bolezni. K obolevnosti in smrtnosti pomembno prispevajo trombotični zapleti, arterijski in venski, ki so znatno pogostejši kot v splošni populaciji. Vključujejo mikrovaskularne dogodke, ki vplivajo na kakovost življenja in makrovaskularne (običajno arterijske > venske), ki prispevajo k obolevnosti in prognozi.

### Epidemiologija

Večina trombotičnih dogodkov se pojavi kratek čas pred oz. ob postavitvi diagnoze. Po podatkih meta-analize iz leta 2019 je prevalenca trombotičnih dogodkov ob postavitvi diagnoze MPN vse do 20%. Najpogosteje se pojavljajo pri PV (pojavnost ocenjena na 5,5 na 100 bolnik-let). Nižja je pojavnost pri ET (1-3 na 100 bolnik-let) in PM (2 na 100 bolnik-let). Po podatkih švedske kohortne raziskave, so imeli bolniki z MPN tri mesece po postavitvi diagnoze trikrat večje tveganje za arterijsko in desetkrat večje tveganje za vensko trombozo v primerjavi z zdravimi ljudmi. Sicer so pri bolnikih z MPN arterijske tromboze 2x pogostejše kot venske. So glavni razlog smrtnosti in se najpogosteje kažejo kot cerebrovaskularni dogodki (možganska kap, TIA), miokardni infarkt in tromboze perifernih arterij. Med venskimi trombozami so najpogostejše globoka venska tromboza spodnjih okončin in pljučna embolija. Pogosteje kot v splošni populaciji pa se pri bolnikih z ET in PV pojavljajo tromboze na neobičajnih mestih (tromboza venskih sinusov, splanhnična venska tromboza). Okoli 40% bolnikov z Budd-Chiarijevim sindromom ima MPN in 30% bolnikov s portalno vensko trombozo. Splanhnična venska tromboza pri teh pacientih velikokrat vodi v diagnozo MPN. Mikrotromboze se lahko kažejo z glavobolom, omotico, eritromelalgijo, parestezijami, motnje vida, akrocianozo in v končni fazi ishemično nekrozo konic prstov. Pogosteje se pojavljajo pri ET, medtem ko so makrovaskularni dogodki cerebro- ali kardiovaskularni trombotični dogodki ter splanhnične venske tromboze pogostejši pri PV.

## Etioopatogeneza

Patogeneza tromboz pri MPN je večfaktorska. Vključuje prisotnost somatskih mutacij (predvsem JAK2), aktivacijo nevtrofilcev in ne-mieloičnih vnetnih celic, povečano nastajanje trombocitov in eritrocitov, nastanek pro-vnetnega okolja, vezavo in adhezijo trombocitov, eritrocitov in levkocitov ter aktivacijo endotelija. Velik prispevek dodajo tudi pridružene bolezni.

## Dejavniki tveganja

Med dejavnike tveganja za nastanek tromboz uvrščamo starost  $\geq 60$  let, predhodne trombotične dogodke, pridružene bolezni oz. dejavnike tveganja za srčno-žilna obolenja (debelost, povišan krvni tlak, hiperlipidemija, kajenje), prisotnost somatskih mutacij (JAK2, CLR, MPL) in določene hematološke parametre (levkocitoza in eritrocitoza).

Že raziskava ECLAP je pokazala, da sta bila starost  $\geq 60$  let in predhodni trombotični dogodki glavna prognostična dejavnika za kardiovaskularne dogodke, predhodni trombotični dogodki pa za nove trombotične dogodke (venski za venske in arterijski za arterijske) pri PV. Novejše raziskave so to potrdile. Arterijski trombotični dogodki so bili pogosteje poročani pri moškem spolu, venski pa pri ženskem. Eritrocitoza (neglede na vzrok) je povezana z večjim tveganjem za nastanek trombotičnih dogodkov. Povečan hematokrit vodi v hiperviskoznost, kar vodi v povečano adhezijo trombocitov in njihovo aktivacijo ter nastanek strdkov. Pri PV pride do dodatnih, večinoma od JAK2 odvisnih mehanizmov, ki prispevajo k nastanku trombotičnih dogodkov. Pri bolnikih s PV je pomembno vzdrževanje hematokrita pod 45%!

Različne študije so ugotovile povezavo med povišanimi vrednostmi levkocitov in trombotičnimi dogodki, na podlagi česar so bila oblikovana priporočila za pričetek zdravljenja MPN s citoreduktivno terapijo ob vrednosti levkocitov nad  $15 \times 10^9/L$ . Patogeneza nastanka trombotičnih dogodkov naj bi bila povezana s povečano aktivacijo nevtrofilcev, nastankom NETs (neutrophil extracellular traps), pa tudi z agregacijo levkocitov s trombociti in endotelijskimi celicami. Trombocitoze po drugi strani niso dokazano povezali s trombotičnimi dogodki, temveč predvsem s krvavitvami, posebno pri vrednostih  $> 1000 \times 10^9/L$ . Potrebno je testiranje na pridobljeno von Willebrandovo bolezen. Na večji nastanek trombotičnih dogodkov pri MPN torej bolj kot samo število trombocitov vpliva prekomerna aktivacija trombocitov in nastanek pro-vnetnega okolja.

JAK2 V167F mutacija dokazano korelira s pogostostjo trombotičnih dogodkov pri MPN. Prospektivna študija je pokazala, da je visoko JAK2 V617F alelna breme ( $> 75\%$ ) povezano s 3,5x večjim tveganjem za trombotične dogodke kot v splošni populaciji. Pri bolnikih s CALR mutacijo

pa je manj trombotičnih dogodkov kot pri bolnikih z JAK2 V167F mutacijo ali s trojno negativnim mutacijskim statusom. Ni jasno, zakaj ti dve mutaciji, ki obe aktivirata JAK-STAT signalno pot, različno vplivata na nastanek trombotičnih dogodkov. Debelost, povišan krvni tlak, hiperlipidemija in kajenje so bili prav tako opredeljeni kot dejavnik tveganja za nastanek predvsem arterijskih trombotičnih dogodkov pri bolnikih z MPN.

Glede na stopnjo tveganja za trombotične dogodke so PV bolniki razdeljeni v dve skupini: visoko (starost več kot 60 let ali predhodni trombotični dogodek) ali nizko (odsotnost obeh dejavnikov tveganja). Bolniki z ET so bili predhodno opredeljeni s pomočjo IPSET (international prognostic score for essential thrombocythemia) točkovnika, ki je vključeval tudi dejavnike tveganja za srčno-žilne dogodke. Njegova revidirana različica paciente glede na stopnjo tveganja razdeli v štiri skupine: visoko (predhodni trombotični dogodek ali starost več kot 60 let in prisotnost JAK2 mutacije), srednje (starost več kot 60 let, brez predhodnega trombotičnega dogodka, odsotnost JAK2 mutacije), nizko (starost 60 let ali manj, brez predhodnega trombotičnega dogodka, prisotnost JAK2 mutacije), zelo nizko (starost 60 let ali manj, brez predhodnega trombotičnega dogodka, odsotnost JAK2 mutacije).

## Zdravljenje

Pri PV in ET je glavni cilj zdravljenja preprečevanje trombotičnih dogodkov in krvavitev.

**PV** - Pri vseh bolnikih s PV (če ni kontraindikacije) uvedemo acetilsalicilno kislino in vzdržujemo hematokrit pod 45% z venepunkcijami. Citoreduktivno terapijo uvedemo bolnikom z visokim tveganjem oz. tistim z nizkim tveganjem in slabo toleranco za venepunkcije ali vztrajno levkocitozo nad  $15 \times 10^9/L$  ali simptomatsko progresivno splenomegalijo. Priporočena je tudi pri bolnikih z nizkim tveganjem in vrednostmi trombocitov nad  $1500 \times 10^9/L$ , s progresivno levkocitozo (100 % povečanje pri začetni vrednosti levkocitov  $< 10 \times 10^9/L$  ali vsaj 50% povečanje vrednosti pri začetni vrednosti  $> 10 \times 10^9/L$ ), prekomernimi venepunkcijami (6 ali večkrat letno, vsaj 2 leti). O citoreduktivni terapiji je potrebno razmisliti tudi pri bolnikih z nizkim tveganjem in srčno-žilnimi dejavniki tveganja ter pri tistih s hudo simptomatiko. Terapija izbora sta hidroksiurea in interferon alfa. Ruksolitininib se zaenkrat za zdravljenje PV uporablja v drugi liniji pri slabem odgovoru ali intoleranci.

**ET** - Pri ET ne obstajajo randomizirane raziskave, ki bi podpirale uporabo acetilsalicilne kisline pri vseh bolnikih. Ta je potrebna pri bolnikih z visoko stopnjo tveganja in priporočljiva tudi pri srednjem in nizkem tveganju v starosti  $\geq 60$  let, JAK2 V617F mutaciji ali pridruženih srčno-žilnih dejavnikih tveganja. Citoredukcija - v prvi liniji s hidroksiureo ali interferonom alfa – je prav tako potrebna v primeru visokega tveganja ali pridruženih neurejenih srčno-žilnih dejavnikov tveganja.

## Viri

1. Rungjirajittranon T, Owattanapanich W, Ungprasert P, Siritanaratkul N., Ruchutrakool T. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of thrombosis and bleeding at diagnosis of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *BMC Cancer*. 2019;19(184).
2. Hultcrantz M, Bjorkholm M, Dickman PW, Landgren O, Derolf AR, Kristinsson SY, Andersson. Risk for arterial and venous thrombosis in patients with myeloproliferative neoplasms: a population-based cohort study. *Ann Intern Med*. 2018;168:317–25.
3. Griesshammer M, Kiladjan JJ, Besses C. Thromboembolic events in polycythemia vera. *Ann Hematol*. 2019;98:1071–82.
4. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2020;95(12):1599-613.
5. Reeves BN, Beckman JD. Novel Pathophysiological Mechanisms of Thrombosis in Myeloproliferative Neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep*. 2021;16(3):304-13.
6. Sankar K, Stein BL, Rampal RK. Thrombosis in the Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms. In: Soff G, ed. *Thrombosis and Hemostasis in Cancer*. Springer; 2019. p. 160-75.
7. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver RT, Hoffman R, et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia*. 2018;32(5):1057–69.
8. Marchetti M, Vannucchi AM, Griesshammer M, Harrison C, Koschmieder S, Gisslinger H, et al. Appropriate management of polycythaemia vera with cytoreductive drug therapy: European LeukemiaNet 2021 recommendations. *Lancet Haematol*. 2022;9(4):301-11.
9. Barbui T, Carobbio A, De Stefano V. Thrombosis in myeloproliferative neoplasms during cytoreductive and antithrombotic drug treatment. *Res Pract Throm Haemost*. 2022;6(1).

# PREPREČEVANJE ZAPLETOV PRI BOLNIKI S KRVNO BOLEZNIJO (ZHS IN SMSZT)

Novosti v profilaksi in cepljenju po presaditvi krvotvornih matičnih celic

*Karla Rener, Gaja Cvejić Vidali*

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

*Karla.rener@kclj.si*

## Uvod

Okužbe so pri bolnikih po presaditvi krvotvornih matičnih celic (PKMC), ki sodijo med najbolj imunokompromitirane bolnike, glavni razlog umrljivosti, zato je preprečevanje le-teh eden temeljnih podpornih stebrov obravnave in preprečevanja.

Zdravljenje z avtologno in alogenično PKMC lahko povzroči okvaro tako humoralne kot celične imunosti, kar lahko poveča tveganje za okužbe. Okužbe so še posebej nevarne pri bolnikih, ki trpijo zaradi dolgotrajnejše nevtropenije (več kot 7 dni) in hude nevtropenije (manj kot  $0,1 \times 10^9/L$ ), ter ko so naravne ovire, kot so sluznica in osrednji venski kateter, porušene zaradi npr. mukozitisa. Pri alogenični PKMC lahko dodatno zmanjšamo delovanje imunskega sistema z imunosupresivnim zdravljenjem, zaradi česar so bolniki bolj dovzetni za okužbe, še posebej tisti z reakcijo presadka proti gostitelju (GvHD). Poleg tega imajo večje tveganje za invazivne glivične okužbe tudi bolniki z aplastično anemijo pred PKMC ter tisti, ki so podvrženi tveganju za razvoj hudega GvHD (kot so skladen nesoroden darovalec (MUD), neskladen soroden darovalec (MMDR), haploidentična PKMC).

Skrb za preprečevanje glivičnih, bakterijskih in virusnih okužb je ključna in se izvaja v skladu z lokalnimi smernicami, kot so standardni operativni postopki KO za hematologijo UKC Ljubljana. V tem prispevku se osredotočamo na najnovije smernice za preprečevanje teh okužb, ki jih priporoča European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-9) in so bile objavljene leta 2022.

## Profilaktično zdravljenje

### Bakterijska profilaksa

Vsi bolniki po aloPKMC in po avtoPKMC, ki razvijejo hudo nevtropenijo (še zlasti pod  $0.1 \times 10^9/L$ ) v trajanju več kot 7 dni, prejemajo protibakterijsko profilakso z levofloksacinom. Tako poskušamo preprečiti hudo potekajoče Gram negativne sepse, ki so bile pred uvedbo profilaktičnega zdravljenja, najpogostejši razlog umrljivosti. Posledica uporabe antibiotikov pa je žal pripeljala do razvoja na fluorokinolone odpornih po Gramu negativnih bakterij v populaciji, zaradi česar je potrebno poznati lokalno mikrobiološko floro in jo spremljati. Problematični postajajo na fluorokinolone odporni sevi *Escherichie coli*, *Klebsiella pneumoniae* in *Pseudomonas aeruginosa* ter nekaterih stafilokokov. Rutinska protibakterijska profilaksa proti po Gramu pozitivnim bakterijam se ne priporoča. Prav tako se ne priporoča profilaksa proti *Clostridium difficile* s fidaksomicinom.

### Virusna profilaksa

#### HERPES VIRUSI

Herpes virusi so močno razširjeni v populaciji in se z njimi pogosto okužimo že zgodaj v življenju. Za preprečevanje reaktivacije po PKMC vsem seropozitivnim bolnikom uvedemo sekundarno protivirusno profilakso z valaciklovirjem 500 mg /12 ur za vsaj 6 mesecev po presaditvi oz. dokler traja imunosupresivno zdravljenje v primeru alogenične PKMC. V primeru, da je bolnik seronegativen, se primarna protivirusna profilaksa okužbe z virusom varičele zostra (VZV) in okužbe s herpes simpleks virusi (HSV-1 in HSV-2) ne priporoča.

Ker lahko do reaktivacije VZV pride tudi v obdobju po 6 mesecih profilakse, v bodoče pričakujemo možnost cepljenja z rekombinantnim cepivom (Shingrix®). Trenutno je na voljo le cepivo z oslabilnim virusom, ki pa je pri osebah z oslabilnim imunskim sistemom kontraindicirano. Cepljenje z rekombinantnim cepivom je v raziskavi pri bolnikih po avtoPKMC preprečilo okužbo v 68%, pri bolnikih s krvnimi raki pa v 87 %. Cepljenje odraslih bolnikov se izvaja z dvema odmerkoma cepiva v razmaku 2-6 mesecev, za bolnike pri katerih se pričakuje, da bodo prejeli imunosupresivno terapijo lahko drugi odmerek prejmejo že po 1-2 mesecih, vendar vsaj 4 tedne pred predvidenim kondicioniranjem.

Bolniki po PKMC bodo lahko cepljenje prejeli po ukinitvi imunosupresivne terapije, ko ne bodo imeli GvHD in ki bodo prejeli zadnjo aplikacijo intravenskih imunoglobulinov pred najmanj 8 meseci. Cepljenje se priporoča tudi bolnikovim svojcem, ki še niso preboleli noric in sicer vsaj 6 tednov pred predvidenim fizičnim stikom z osebo po PKMC.

## CITOMEGALOVIRUS

Seropozitivni bolniki po PKMC (CMV R+) ali seronegativni prejemniki KMC

seropozitivnega dajalca (CMV D+/R-) v sklopu sekundarne profilakse prejemajo letermovir 480 mg dnevno (ob sočasnem prejemanju ciklosporina 240 mg dnevno). Profilaktično zdravljenje dopolnjujemo s spremljanjem CMV-antigenemije in CMV predbolezenskim zdravljenjem. Mnenja glede primarne ter sekundarne profilakse in predbolezenskega zdravljenja CMV okužbe so nekoliko deljena. Vsekakor je umrljivost CMV bolezni še vedno visoka in moramo navkljub profilaktičnemu zdravljenju pomisliti na možnost razvoja rezistence in CMV bolezni.

## VIRUS EPSTEIN-BARR

Učinkovite protivirusne profilakse proti EBV reaktivaciji ni. Bolnikom po alogenični PKMC z visokim tveganjem okužbe (EBV D+/R-) spremljamo EBV DNK virusno breme s PCR iz limfocitov periferne krvi vsaj enkrat tedensko od dneva D+0 do dneva D+90. Spremljanje bolnikov z a/cGvHD traja dokler prejemajo imunosupresivno zdravljenje.

## VIRUSI HEPATITISOV

ECIL-9 priporočila omenjajo večje tveganje za okužbo z virusom hepatitisa E (HEV) pri prejemnikih KMC. Običajno se HEV prenaša z okuženo hrano, vendar je možen tudi prenos preko transfuzij ali preko darovalčevih KMC. Serološko presajanje prejemnikov na HEV se ne priporoča, diagnozo postavimo s pomočjo PCR HEV. Zaenkrat testiranje darovalcev na HEV PCR ni v priporočilih. Primarna in sekundarna profilaksa ne obstaja, po potrjeni okužbi zdravimo z ribavarinom.

## COVID-19

Pri prejemnikih KMC je smrtnost po okužbi z COVID-19 višja, zlasti pri tistih, ki razvijejo okužbo v prvih 30 dni po presaditvi, pri starejših, bolnikih z izhodiščno slabšim telesnim stanjem in pri bolnikih na imunosupresivni terapiji. Preživetje je nižje pri CMV seropozitivnih bolnikih. Priporočila se cepljenje proti COVID-19 vsaj 6 mesecev po PKMC. Priporočila glede cepljenja ter ostalih oblik zdravljenja se spreminjajo v skladu s prevladujočim virusnim sevom in njegovo odzivnostjo na razpoložljiva zdravila.

## VIRUSNE OKUŽBE DIHAL

Bolniki po PKMC so bolj dovzetni za okužbe z respiratornimi virusi, katerih potek je daljši in bolj zapleten, dlje časa so tudi kužni. Pogostejši so zapleti s sekundarnimi bakterijskimi superinfekcijami in invazivnimi glivičnimi okužbami. Svetuje se cepljenje proti sezonski gripi in



zdravljenje s oseltamivirjem v primeru okužbe z virusom Influenca A in B. V primeru okužbe s respiratornim sincicijskim virusom se priporoča zdravljenje z ribavarinom in poliklonskimi imunoglobulini v odmerku 500-750 mg/kg.

### Protiglivična profilaksa

Bolniki po avtologni PKMC imajo nizko tveganje za invazivne glivične okužbe ne glede na osnovno bolezen. Primarna protiglivična profilaksa zato ni priporočena, z izjemo flukonazol 200 mg / 12 ur za preprečevanje sluznične okužbe s *Candida sp.* tekom nevtropenije. Skladno z lokalnimi priporočili uporabljamo flukonazol 200 mg /12 ur v sobah s HEPA filtracijo ali posakonazol (300 mg /12 ur prvi dan, nato 300 mg/dan) v primeru kolonizacije z na flukonazol rezistentno *Candido* (npr. *C. glabrata*).

Visoko tveganje za invazivno glivično bolezen imajo tisti bolniki, ki imajo pred alo PKMC še vedno aktivno bolezen, ki so po presaditvi popkovnične krvi ali haplo PKMC ter bolniki, ki so že utrpeli glivično okužbo. Dejavniki tveganja za invazivne glivične okužbe v obdobju post-ugnezditve sta akutni in kronični GvHD, predvsem aGvHD gradus III in IV, aGvHD gradus II bolnika po haploPKMC, GvHD neobčutljiv na kortikosteroidno zdravljenje in cGvHD po predhodnem aGvHD. Tveganje za invazivno glivično okužbo se poveča ob sočasni okužbi s CMV. Prva izbira protiglivične profilakse je peroralni posakonazol z udarnim odmerkom 300 mg /12 ur prvi dan nato 300 mg/d, saj deluje tako proti kandidam kot aspergilusu. Pri bolnikih z cGvHD brez predhodnega aGvHD se uporaba protiglivične profilakse ne priporoča.

### Pneumocystis jirovecii (PCP) in Toxoplasma gondii

Novosti na področju preprečevanja PCP ni; s preprečevanjem PCP pričnemo takoj po vgnezditev presadka s trimetoprim/sulfametoksazolom 80 mg/400 mg 2 tbl. 3x na teden (ponedeljek, sredo, petek). TMP/SMX deluje profilaktično tudi proti *Toxoplasma gondii*. Bolniki, ki so alergični na zdravilo, prejema pentamidin inhalacije v odmerku 300 mg vsake 4 tedne. Inhalacije pentamidina ne omogočajo zaščite pred *Toxoplasma gondii*, zato bolnikom, alergičnim na TMP/SMX in

v preteklosti pozitivnih na okužbo s *Toxoplasma*, predpišemo Dapson v odmerku 50 mg/12 ur.

## Cepljenje po PKMC

Cepjenje oseb po PKMC je priporočljivo, ker se raven protiteles proti boleznim, ki jih preprečujemo s cepljenjem, zmanjšuje še več let po presaditvi, če osebe ne revakciniramo. Cepjenja z živimi cepivi ni priporočljivo začeti prej kot 24 mesecev po PKMC. Zaradi preprečevanja prenosa okužb je priporočljivo svetovati cepljenje družinskih in bližnjih kontaktnih oseb bolnika proti covid-19 in gripi, pa tudi proti noricam, če jih še niso preboleli. Novost s področja cepljenja sta rekombinantno cepivo proti noricam, ki še ni na voljo in je omenjeno v sklopu virusne profilakse ter požitveni odmerek 23-valentnega cepiva proti Pnevmonoku po 5 letih.

## Antimikrobna profilaksa bolnikov po zdravljenju s CAR-T celicami

Antibiotično profilakso bolnik prejme le v primeru podaljšane kritične nevtropenije. Bolnike z življenjsko ogrožajočo okužbo z enkapsuliranimi bakterijami in hipogamaglobulinemijo  $< 4 \text{ g/L}$  zdravimo z intravenskimi imunoglobulini. Protivirusna profilaksa (valaciklovir  $500 \text{ mg /12 ur}$ ) in profilaksa proti PCP (TMP/SMX 2 tbl 3x tedensko) se priporoča od prvega dneva limfodeplecijskega zdravljenja do 1 leta po CAR-T zdravljenju in ob vrednosti  $\text{CD4}^+ > 0.2 \times 10^9/\text{L}$ . Protiglivična profilaksa se rutinsko ne priporoča, izjemoma jo prejmejo bolniki s hudo nevtropenijo ( $< 0,5 \times 10^9/\text{L}$ ), ki traja nad 14 dni in ob kortikosteroidnem zdravljenju  $> 72 \text{ ur}$ .

## Zaključek

Preprečevanje okužb, bodisi s profilaktičnim protimikrobnim zdravljenjem kot cepljenjem, je zelo pomemben del podpornega zdravljenja bolnikov po presaditvi krvotvornih matičnih celic. Četudi smo s protimikrobnim zdravljenjem pomembno zmanjšali obolevnost in smrtnost zaradi okužb, pa uporaba antibiotikov vodi v razoj odpornih klic, ki postajajo vedno večji problem. Skladno s tem je nujno spremljanje in poznavanje lokalnega epidemiološkega stanja in ustrezno izbirati antimikrobno terapijo. Pri cepljenju pričakujemo novo rekombinantno cepivo proti VZV, ki se je že izkazalo za učinkovito in varno pri hematoloških bolnikih. Po 5 letih se priporoča revakcinacija s 23-valentnim cepivom proti pnevmokoku. Glede na naravo virusnega spreminjanja, lahko pričakujemo še nadaljnje spreminjanje smernic cepljenja proti COVID-19.

<b>Bolezen/ povzročitelj - cepivo</b>	<b>Priporočilo (meseči po PKMC)</b>	<b>Priporočena shema (presledki v mesecih)</b>
<b>Pnevmokok</b> - 13-val konjugirano mrtvo (PCV 13) - 23-val polisaharidno mrtvo (PPV 23)	<b>Da</b> (3 - 6)	<b>3 odmerki PCV 13</b> <b>in kot 4. odmerek PPV 23</b> <b>(0, 2, 4, 10);</b> <b>Revakc. s PPV 23 po 5 letih</b>
<b>Davica, tetanus, oslovski kašelj,</b> <b>hemofilus, influence tip b, otroška</b> <b>paraliza</b> - 5-val mrtvo (DiTePer/Hib/IPV)	<b>Da</b> (6 - 12)	<b>3 odmerki</b> <b>(0, 2, 6 - 12)</b>
<b>Hepatitis B</b> - rekombinantno mrtvo	<b>Da</b> (6 - 12)	<b>3 odmerki</b> <b>(0, 1, 6)</b>
<b>Gripa</b> - mrtvo	<b>Da</b> – sezonsko (sept. – dec.) (4 - 6)	<b>1 odmerek</b>
<b>Ošpice, mumps, rdečke</b> - živo oslajljeno (OMR)	<b>Da</b> (>24)	<b>2 odmerka</b> <b>(0, 1)</b>
<b>Norice</b> - živo oslajljeno	<b>Da</b> (>24)	<b>2 odmerka</b> <b>(0, 2)</b>
<b>Covid-19</b> - mRNA cepivo	<b>Da</b> (3 – 6)	<b>2 odmerka po shemi, poživitveni</b> <b>odmerek po 3 – 6 mesecih</b>
<b>Meningokok</b> - 4-val konjugirano mrtvo (A, C, W-135, Y) - rekombinantno mrtvo (B)	Kot za ostalo populacijo (6 - 12)	<b>1 odmerek</b> <b>2 odmerka (0, 1)</b>
<b>Humani papilomavirusi</b> - 9-val mrtvo (HPV)	Kot za ostalo populacijo (6 - 12)	<b>2 odmerka pri &lt;15 let</b> <b>3 odmerki pri ≥ 15 let</b> <b>(0, 6 oz. 0, 2, 6)</b>
<b>Klopni meningoencefalitis</b> - mrtvo	Kot za ostalo populacijo (6 - 12)	<b>3 odmerki (0, 1-3, 5-12);</b> <b>Revakcinacije na 3 oz. 5 let -</b> <b>samoplačniško</b>

**Tabela 1: Shema cepljenja bolnikov po PKMC**

## Viri

1. Tomblyn M, Chiller T, Einsel H in sod. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15: 1143-1238.
2. Report of the 25th Infectious Diseases Working Party Educational Course. Dosegljivo na <https://www.ebmt.org/ebmt/news/report-25th-infectious-diseases-working-party-educational-course-3-5-november-2022>
3. Matičič M, Rožič M in sod. Okužbe z virusom varičele zostra in njeno preprečevanje, Združenje za infektologijo pri SZD, 2022. Dosegljivo na [https://www.kclj.si/dokumenti/ZBORNIK\\_strokovnega\\_izobrazevanja.pdf](https://www.kclj.si/dokumenti/ZBORNIK_strokovnega_izobrazevanja.pdf)
4. ECIL-9 priporočila - toxoplasmoza. Dosegljivo na [https://www.ecil-leukaemia.com/images/resources/2022part2/ECIL9-\\_TOXO\\_GROUP\\_Final\\_Recommendation.pdf](https://www.ecil-leukaemia.com/images/resources/2022part2/ECIL9-_TOXO_GROUP_Final_Recommendation.pdf)
5. ECIL-9 priporočila - virusi hepatitisa. Dosegljivo na [https://www.ecil-leukaemia.com/images/resources/2022/ECIL9\\_Update\\_on\\_Hepatitis\\_Revised\\_Guidelines.pdf](https://www.ecil-leukaemia.com/images/resources/2022/ECIL9_Update_on_Hepatitis_Revised_Guidelines.pdf)
6. Maertens JA, Girmenia C, Brueggemann RJ in sod. European guidelines for primary antifungal prophylaxis in adult haematology patients: summary of the updated recommendations from the European Conference on Infections in Leukaemia. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73: 3221-3230.
7. Christopheit M, Schmidt-Hieber M, Sprute R in sod. Prophylaxis, diagnosis and therapy of infections in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell transplantation. 2020 update of the recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Medical Oncology (DGHO). *Ann of Heamat* 2021; 100: 321-336.
8. Priporočila za cepljenje bolnikov po PKMC, NIJZ 2022. Dosegljivo na [https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/cepljenje\\_po\\_pkmc\\_-\\_april\\_2022.pdf](https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/cepljenje_po_pkmc_-_april_2022.pdf)
9. Roystone L, Roystone E, Masouridi-Levrat S in sod. Letermovir Primary Prophylaxis in High-Risk Hematopoietic Cell Transplant Recipients: A Matched Cohort Study. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(4): 372.
10. Girmenia C, Raiola AM, Pichiocci A in sod. Incidence and outcome of invasive fungal diseases after allogeneic stem cell transplantation: a prospective study of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(6):872-80.
11. Standardni operativni postopki UKC Ljubljana, Klinični oddelek za hematologijo: SOP 0237, SOP 0466, SOP 0465, SOP 0471.

## Nova dognanja o prehrani po presaditvi krvotvornih matičnih celic

*Skopec Barbara, Rozman Matija*

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

*Barbara.skopec@kclj.si*

### Uvod

Okužbe in z njimi povezani zapleti v obdobju nevtropenije po presaditvi krvotvornih matičnih celic (PKMC) so povezani z večjo obolevnostjo in umrljivostjo. Izguba integritete gastrointestinalne sluznice zaradi visokodozne kemoterapije (KT) in/ali radioterapije, imunosupresija in podaljšana nevtropenija so dejavniki tveganja za razvoj hudih okužb z izvorom v prebavilih. Glavni patogeni so predvsem gram negativni bacili, ki jih najdemo v črevesju – Pseudomonas, Escherichia, Klebsiella, Proteus in od plesni Aspergillus. Največ skrbi povzroča bakterijska translokacija preko črevesne stene, ki omogoča nastanek žarišč okužbe tudi izven črevesja. Pred več kot 50 leti so domnevali, da bi zmanjšanje števila patogenov v prebavnem traktu z izključitvijo določenih živil, ki lahko delujejo kot vektor za bakterije, lahko koristilo bolnikom z nevtropenijo. Prva dieta, katere cilj je bil zagotoviti vnos hrane popolnoma brez mikrobov, je bila razvita v šestdesetih letih prejšnjega stoletja. Danes je restriktivna dieta z majhno vsebnostjo bakterij standard oskrbe. Kljub temu, da njena dobrobit ni bila nikoli podkrepljena in potrjena v znanstvenih kliničnih raziskavah, večina transplantacijskih centrov se še vedno uporablja v vsakodnevni klinični praksi. European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN) je v svojih kliničnih smernicah iz leta 2021 (ESPEN practical guideline: Clinical Nutrition in Cancer) zaključila, da zaradi pomanjkanja ustreznih dokazov o učinkovitosti, nevtropenična dieta ni priporočljiva. Podobno mnenje je podala tudi Klinična skupina za bolnišnično higieno in preventivo infekcijskih bolezni pri nemškem Robert Koch inštitutu v leta 2021. Slovenska priporočila za prehrano pri nevtropeničnih bolnikih in tistih po PKMC so iz leta 2019. Svetujejo prehrano z majhno vsebnostjo bakterij bolnikom po zdravljenju s KT dokler se vrednosti nevtrofilnih granulocitov ne normalizirajo, bolnikom po avtologni PKMC 6 mesecev, po alogenski PKMC pa 3 mesece po končanem zdravljenju z imunosupresivnimi zdravili. Na 64. letnem srečanju in razstavi Ameriškega združenja za hematologijo (ASH) je italijanska raziskovalna skupina pod vodstvom Federica Stelle predstavila rezultate prve prospektivne raziskave faze III.

## Raziskava Neurodiet

Gre za multicentrično, randomizirano, neinferiorno raziskavo faze III. Vključili so 247 bolnikov, randomizirali so 224 bolnikov (razmerje 1:1). V času od začetka KT do prenehanja nevtropenije je 112 bolnikov prejemalo restriktivno prehrano (protective diet- PD), 112 pa nerestriktivno prehrano (non-restrictive diet- NRD). PD je bila sestavljena iz hrane, kuhane pri  $>80^{\circ}\text{C}$  in je izključevala vso surovo hrano, medtem ko je bila dieta NRD skladna z bolnišničnimi higienskimi standardi in je izključevala surove ribe in meso. Bolnike po alogenski PKMC so spremljali do D+100, ostale do D+30.

Primarni opazovani dogodek je bil dokazati odsotnost pomembnih razlik v okužbah in smrtih v obdobju nevtropenije med obema krakoma. Sekundarne končne točke so vključevale oceno okužb prebavil (GI), vročino neznanega izvora, spremembo telesne teže, dolžino bivanja v bolnišnici, 30-dnevno ocenjeno skupno preživetje in kumulativno incidenco akutne GvHD (aGvHD).

Klinične in demografske značilnosti vključenih bolnikov so bile v obeh skupinah podobne. Roki sta bili dobro uravnoteženi glede na spol, starost, bolezen, uporabo protimikrobne profilakse in trajanje nevtropenije. Šestinsedemdeset odstotkov analiziranih bolnikov so zdravili z avtologno PKMC, 21 % pa alogensko PKMC.

V kumulativni incidenci okužb niso ugotovili nobene razlike: okužbe stopnje  $>2$  so se pojavile pri 38 (34 %) in 44 bolnikih (39 %), ki so bili v skupini PD oziroma NRD ( $p = 0,5$ ).

Incidenca vročine neznanega izvora (vključno s febrilno nevtropenijo) in sepse je bila podobna v obeh krakih, 43 % pri PD v primerjavi s 39 % pri NRD ( $p=0,2$ ) in 11 % pri PD v primerjavi s 14 % pri NRD ( $p=0,5$ ). Bakterije, ki so bile najpogosteje izolirane iz hemokultur, so pripadale družini Enterobacteriaceae v obeh rokah.

Incidenca potrjenih okužbe prebavil, opredeljenih kot prisotnost simptomov prebavil, driske in mikrobiološke izolacije, je bila med krakoma primerljiva (7 % pri PD proti 3 % pri NRD,  $p=0,7$ ). V obeh krakih je bila Clostridium difficile najpogosteje izolirana bakterija pri testu blata.

Skupina NRD je imela manjšo izgubo telesne teže po 1 mesecu (povprečno  $-2,7$  kg proti  $-3,7$  kg v skupini PD;  $P = ,04$ ). Statistično pomembnih razlik niso ugotovili pri incidenci slabosti in mukozitisa (16 % pri PD proti 15 % pri NRD  $p>0,99$  in 62 % pri PD proti 60 % pri NRD;  $p=0,8$ ), dolžini hospitalizacije (povprečno 21 dni pri PD v primerjavi z 22 dnevi pri NRD,  $p = 0,47$ ), uporabi parenteralne prehrane (23 % proti 26 %;  $p = 0,8$ ) in trajanje uporabe parenteralne prehrane (povprečno 6,9 dni proti 6,7 dni,  $p = 0,8$ ).

Pri bolnikih, ki so jih zdravili z alogensko PKMC, je bila incidenca aGVHD stopnje  $\geq 2$  med krakoma podobna (17 % pri PD proti 25 % pri NRD,  $p=0,7$ ). Prav tako niso ugotovili razlik v pojavnosti akutne

GVHD katere koli stopnje in črevesne akutne GVHD, oziroma 30 % pri PD vs. NRD (RR = 1,6; 95 % IZ = 0,3–7,4, p = 0,6) in 13% pri PD napram 8% pri NRD (p=0.6).

V 30 dneh so poročali le o eni smrti zaradi sindroma sproščanja citokinov po zdravljenju ruksolitinibom pri bolniku v kraku NRD po alogenski PKMC zaradi mieloproliferativne neoplazme. Največja in statistično pomembna razlika med podskupinama je bila pri zadovoljstvu bolnikov s prehrano. Iz analize dnevnikov, ki so jih izpolnili bolniki, je bila NRD povezana z večjim zadovoljstvom (35% proti 16%, p = 0,006).

## Zaključek

Rezultati prve prospektivne randomizirane raziskave, ki je dokazala neinferiornost nerestriktivne prehrane v primerjavi z restriktivno dieto z majhno vsebnostjo bakterij pri bolnikih po PKMC, skupaj s podatki, objavljenimi v okoljih, ki niso posttransplantacijski, kažejo, da je uporaba restriktivne diete nepotrebno breme za kakovost življenja bolnikov in da je morda prišel čas, da vsaj pri bolnikih po avtologni PKMC še dodatno sprostimo omejitve pri prehranjevanju po posegu.

## Viri

1. Skopec B. Prehrana pri nevtropeničnem bolniku in bolniku z oslabljenim imunskim odzivom po presaditvi krvotvornih matičnih celic. Ljubljana: Janssen, farmacevtski del Johnson & Johnson; 2019.
2. Moody K. Neutropenic Dietary Restrictions for Hematopoietic Stem Cell Patients: Time for a Change. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019 Jul;25(7):e223-e225.
3. Jubelirer SJ. The benefit of the neutropenic diet: fact or fiction? *Oncologist.* 2011;16(5):704-7.

## Preprečevanje mukozitisa ob PKMC

*Mojca Huber*

*Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana*

*huber29@gmail.com*

Oralni mukozitis ali stomatitis je akutno vnetje sluznice ustne votline in ustnega dela žrela. Povzroča ga večina kemoterapevtikov, ki se uporabljajo za sistemsko zdravljenje malignih bolezni. Ti kemoterapevtiki se uporabljajo kot predpriprava na presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC). Oralni mukozitis povzroča neprijetne občutke, od pekočine do hujše bolečine, ki otežijo žvečenje, požiranje in govor.

### **Značilnosti oralnega mukozitisa**

Glede na stopnjo izraženosti razdelimo oralni mukozitis na več stopenj, ki sledijo časovnemu poteku dogodkov in s tem intenzivnosti mukozitisa. Temu so prilagojena tudi priporočila za preventivno in terapevtsko ukrepanje.



Stopnje prizadetosti ustne sluznice in znaki	Simptomi in ukrepi
STOPNJA O Normalna sluznica	Ni simptomov -ukrepi za vzdrževanja ustne higijene in preprečevanje nastanka vnetja
STOPNJA I Rdečina (eritem), obložen jezik	Ni simptomov ali blaga pekoča bolečina -ukrepi za vzdrževanja ustne higijene in preprečevanje nastanka vnetja
STOPNJA II Posamezne manjše in plitve razjede	Zmerna bolečina, ki ne vpliva na vnos hrane, oteženo požiranje -antiseptiki, pripravki, blagi analgetiki -prilagojena hrana
STOPNJA III Obsežne in globoke razjede Krvavitve že ob manjši poškodbi	Huda bolečina, oteženo požiranje ali nezmožnost požiranja, zmanjšan vnos hrane, nevarnost sistemske okužbe -antiseptiki, protivnetni pripravki, močni analgetiki -hranjenje po sondi ali intravenskem katetru -antibiotiki, antimikotiki ob znakih okužbe
STOPNJA IV Propad tkiva Hude in spontane krvavitve	Ogroža življenje -urgentno posredovanje -bolnišnično zdravljenje

Tabela 1: Stopnje prizadetosti ustne sluznice, znaki, simptomi in ukrepi.

Oceno ustne sluznice izvajamo enkrat dnevno pri stopnjah nič in ena, ter dvakrat dnevno pri stopnjah dve do štiri.

### Znaki in simptomi

Vnetje sluznic v ustni votlini in žrelu se kaže z rdečino in oteklino, ki se lahko pojavi 5 do 7 dni po začetku apliciranja kemoterapije in PKMC. Občutek sprva rahlo pekoče bolečine ob stopnjevanju vnetja, predvsem pa s pojavom razjed po sluznici, lahko preide v zmerno ali hudo bolečino. Ta je še posebej izražena pri govoru, žvečenju in požiranju hrane, tekočine ali sline oz. je posledica gubanja poškodovane sluznice med govorjenjem in aktom požiranja. Slina se lahko zgosti in lepi na zobe in sluznico. Slino je tako težje je izpljuniti ali požreti, kar prispeva k nastanku zobnih oblog, v katere se ujamejo ostanki hrane, ki predstavljajo ugodno gojišče za bakterije in glive. Te spremembe lahko privedejo do spremenjene sestava ustne mikroflore, poveča se delež anaerobnih bakterij, razraščati se pričnejo glive, kot npr. *Candida albicans*, kar ob prisotnih razjedah in zmanjšanju števila belih krvnih teles (levkocitov) v krvi bolnikov, povečuje nevarnost

za nastanek okužb v ustih in žrelu; Tem težavam se pridružuje delna ali popolna izguba občutka za okus (hipogevozija in agevozija).

### **Preprečevanje in zdravljenje oralnega mukozitisa po PKMC**

Nastanka oralnega mukozitisa pri bolnikih po PKMC se ne da popolnoma preprečiti, lahko pa odložimo nastanek in omilimo njegov potek ter zmanjšamo že nastale težave. Priporočeni preventivni ukrepi so usmerjeni v izboljšanje ustne higijene.

Pred začetkom zdravljenja se bolnikom opravi pregled ustne votline in zob. Za natančen pregled zobovja se praviloma opravi tudi slikanje zob (ortopan). V kolikor je potrebno ekstrakcija bolnih zob, je potrebna 10 dnevna pavza pred začetkom zdravljenja, zaradi celjenja ran.

Ščetkanje zob se izvaja dvakrat dnevno, po ostalih obrokih ter vmes se izvaja redno in natančno nego ustne votline in jezika. Priporoča se uporabo mehkih zobnih ščetk. Agresivne načine čiščenja zob in ustne votline z uporabo električne zobne prhe in zobne nitke se zaradi možnosti poškodb medzobnih prostorov odsvetuje. Ustna votlina se ne sme izsušiti, za vlaženje uporabljamo Žajbljev čaj, raztopino Sode bikarbone ali druge aseptične pripravke glede na stanje ustne sluznice. Ustna nega se izvaja minimalno 6 krat dnevno, poskrbeti je potrebno tudi za navlažene ustnice.

Zaužita hrana naj bo primerne temperature (mlačna, ne vroča) in blago začinjena oz. prilagojena zmožnosti žvečenja in požiranja, da ne povzroča dodatnega draženja ali poškodb sluznice ter spodbuja nastanka zobne gnilobe (karies).

Poskrbeti je potrebno za bolniku primeren količinsko ustrezen vnos tekočin za zagotovitev ustrezne hidracije telesa in vlažnosti sluznic. Priporoča se pitje dveh litrov vode ali nesladkanega čaja, pitje gaziranih pijač in alkohola se zaradi draženja in sušenja sluznice odsvetuje. V kolikor vnos hranil zaradi stanja ustne sluznice ne možen se svetuje uvedba parenteralne prehrane.

### **Viri**

1. [https://www.zbornica-zveza.si/sites/default/files/publication\\_\\_attachments/ustna\\_nega\\_-\\_vloga\\_zdravstvene\\_nege\\_za\\_zdravje\\_ustne\\_votline.pdf](https://www.zbornica-zveza.si/sites/default/files/publication__attachments/ustna_nega_-_vloga_zdravstvene_nege_za_zdravje_ustne_votline.pdf)
2. <https://core.ac.uk/download/pdf/333595888.pdf>
3. <https://www.zobozdravnikmaribor.si/blog/kemoterapija-in-vpliv-na-ustno-votlino/>

## HEMATOLOGIJA IN TRANSFUZIJSKA MEDICINA (ZHS IN ZTMS)

### Avtoimunske citopenije, vzrok in diagnostika

*Mihela Šajn, Matevž Škerget*

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

*Mihela.sajn@kclj.si*

Avtoimunske citopenije so posledica motenega uravnavanja imunskega sistema, ki povzroči izgubo imunske tolerance na glikoproteine, izražene na površini krvnih celic. Avtoprotitelesa se vežejo na zrele krvne celice in njihove mlajše oblike, nato jih makrofagi fagocitirajo in odstranijo iz krvnega obtoka. Avtoimunska hemolitična anemija, avtoimunska trombocitopenija in avtoimunska nevtropenija se pojavljajo izolirano ali kombinirano. Lahko so primarne ali sekundarne. Med sekundarnimi vzroki gre najpogosteje za maligna obolenja, okužbe, izpostavljenost nekaterim zdravilom in vezivnotkivne bolezni.

Ugotavljanje avtoimunske etiologije zahteva skrbno vključitev klinične anamneze, kliničnega pregleda in laboratorijskih preiskav. Pogosto ni posebnega diagnostičnega testa, zaradi česar je avtoimunska citopenija diagnoza izključitve.

### **Avtoimunska hemolitična anemija (AIHA)**

Incidenca je 1/100.000. Tradicionalno jo razvrščamo glede na temperaturno odvisnost vzročnega avtoprotitelesa. Topla protitelesa povzročijo 90 % AIHA pri odraslih. So protitelesa IgG in se najbolj učinkovito vežejo pri telesni temperaturi okoli 37 °C, kar povzroči ekstravaskularno hemolizo. Hladna protitelesa oz. aglutinini so protitelesa IgM in se najbolj učinkovito vežejo pri temperaturi okoli 4 °C, kar povzroči aktivacijo komplemента in intra- ali ekstravaskularno hemolizo. Za Evansov sindrom je značilen pojav dveh ali več imunskih citopenij, največkrat AIHA in ITP. V približno 50 % primerov je AIHA primarna, brez jasne povezave z osnovno boleznijo. Sekundarna se najpogosteje pojavi v kontekstu malignih obolenj, avtoimunskih bolezni ali zaradi zdravil (tabela 1). Laboratorijske preiskave pokažejo normocitno anemijo, retikulocitozo, zvišano laktat dehidrogenazo (LDH), povišan nekonjugiran (direktni) bilirubin, znižan haptoglobin, pri

intravaskularni hemolizi še pozitiven test z merilno paličico na kri v urinu, hemosiderin v urinu. V komentarju pri diferencialni krvni sliki (DKS) zasledimo sferocitozo, polikromazijo, če so prisotni hladni aglutinini še aglutinacijo eritrocitov. Ključna preiskava je pozitiven direktni antiglobulinski test (DAT, poimenovan tudi Coombsov test)\* v odsotnosti drugega očitnega vzroka hemolize. Test zazna IgG protitelesa in/ali C3d del komplementa, vezane na membrano rdečih krvnih celic. Bolnikove eritrocite se spere in se jim nato doda specifična protitelesa proti IgG in C3 komplementu. Če sta IgG in komplement vezana na membrano rdečih krvničk, pride do aglutinacije in test je pozitiven. Pri bolnikih pozitivnih na C3 ± IgG, je treba določiti še morebitno prisotnost hladnih protiteles oz. aglutininov z uporabo neposrednega aglutinacijskega testa (DAGgT) pri sobni temperaturi. Če je test pozitiven določimo še titer hladnih aglutininov, klinično pomembni so titri enaki ali večji od 1:64.

Nadaljnje preiskave so namenjene izključitvi sekundarnega vzroka in morajo vključevati virusno serologijo (HIV, HBV, HCV), elektroforezo beljakovin z imunofiksacijo in laboratorijske preiskave v smeri avtoimunskih obolenj (ANA, ENA, Anti-DNA). Za izključitev limfoproliferativnega obolenja je potrebno razmisliti o računalniški tomografiji (CT) vratu/prsnega koša/trebuha. Pri bolnikih z boleznijo hladnih aglutininov, ki so stari  $\geq 60$  let, pri katerih anamneza, klinični pregled in krvna slika kažejo na infiltracijo kostnega mozga, opravimo biopsijo kostnega mozga.

\*Bolniki z AIHA so redko DAT negativni, na primer zaradi nizke afinitete protiteles, nizkih ravni protiteles, ali zaradi imunoglobulina, ki ni testiran (npr. AIHA samo za IgA). Bolniki z DAT-negativno AIHA imajo na splošno blažjo anemijo in se odzivajo na steroide.

### **Avtoimunska trombocitopenija (ITP)**

Incidenca v Evropi je 2 do 5/100.000. Pri nastanku je vpletenih več mehanizmov. Glavna motnja je nastanek protiteles proti trombocitom. Protitelesa aktivirajo makrofage, ki trombocite fagocitirajo, kar povzroči razpad v retikuloendotelijskem sistemu vranice in jeter, ali pa privedejo do aktivacije komplementa in neposredne lize trombocitov. Poleg protiteles proti zrelim trombocitom so prisotna tudi protitelesa proti megakariocitom in relativno pomanjkanje endogenega trombopoetina, kar vodi v zmanjšano trombopoezo. Pomembno vlogo ima tudi motnja T celične imunosti, nesorazmerje med T regulatornimi celicami, T celicami pomagalkami in izguba T celične tolerance. Laboratorijske preiskave pokažejo izolirano nizko število trombocitov  $<100 \times 10^9/L$ . Pomembno je, da izključimo lažno trombocitopenijo in sindrom diseminirane intravaskularne koagulacije (DIK). Nadaljnje preiskave so indicirane za izključitev sekundarnega vzroka (tabela 1), saj je ITP diagnoza izključitve. Z biokemičnimi laboratorijskimi preiskavami krvi izključimo bolezen jeter, ledvic, ščitnice (TSH, T3, T4) in vezivnotkivne bolezni ANA, ENA, C3, C4, Anti-DNA, antifosfolipidna protitelesa). Izključimo okužbo s H.pylori (antigen v blatu ali dihalni test) in opravimo virusno serologijo (HIV, HBV, HCV, CMV, EBV, parvo B19).

Vrednost LDH je pri ITP večinoma normalna, povečana lahko govori v prid limfoproliferativnega obolenja.

Citološki pregled kostnega mozga ni rutinska preiskava. Priporočamo jo pri bolnikih, ki so neodzivni na zdravljenje z glukokortikoidi, pri starejših od 60 let za izključitev mielodisplastičnega sindroma in pri bolnikih, pri katerih načrtujemo zdravljenje s splenektomijo.

### **Avtoimunska nevtropenija (AIN)**

Je heterogena skupina bolezni, za katero je značilna proizvodnja protiteles IgG, usmerjenih proti nevtrofilcem, kar povzroči fagocitozo in razpad v retikuloendotelijskem sistemu vranice. Lahko je primarna ali sekundarna (tabela 1). Primarna oblika je prevladujoča pri otrocih, pri odrasli gre večinoma za sekundarno kronično obliko. Kronična benigna/avtoimunska nevtropenija je v glavnem diagnoza izključitve. Meritve protiteles proti nevtrofilcem nimajo velike vloge pri diagnozi, saj ima večina testov visoko stopnjo lažno negativnih in pozitivnih rezultatov. Obstajajo specializirani testi za protitelesa proti posameznim epitopom, ki so lahko bolj specifični.

Nevtropenija je lahko znak resnejše krvne bolezni, imunske pomanjkljivosti ali sistemske vezivnotkivne boleti. V sklopu diagnostike opavimo presejalne revmatološke priskave (ANA, ENA). Čeprav obstaja širok spekter imunskih pomanjkljivosti, ki so povezana z nevtropenijo, običajno zadostuje kvantativna določitev podvrst imunoglobulinov. Veliko uporabno vrednost ima elektroforeza beljakovin, poliklonska hipergamaglobulinemija lahko nakazuje sistemsko bolezen veziva, znižana vrednost gamaglobulinov imunsko pomanjkljivost. Za citološki pregled kostnega mozga se odločimo ob poslabšanju nevtropenije ali pojavu drugih citopenij. Izjema so huda okužba, hud stomatitis, B simptomi, bi/pancitopenija, ko punkcijo kostnega mozga za izključitev resne krvne bolezni opravimo čim prej.

## Sekundarni vzroki avtoimunskih citopenij

	AIHA	ITP	AIN
<b>Zdravila</b>	penicilini, cefalosporini, rifampicin, kinidin, levodopa, fludarabin, kladribin, prokainamid itd.	penicilini, linezolid, rifampicin, sulfonamidi, kinin, fenitoin, karbamazepin, valproat, NSAR, cepiva	penicilini, sulfonamidi, propiltiouracil, kinin, fenitoin
<b>Limfoproliferativne bolezni</b>	KLL, drugi NHL	KLL, LGL, drugi NHL, HL	LGL, DCL, HL
<b>Sistemske bolezni veziva</b>	SLE, antifosfolipidni sindrom	SLE, antifosfolipidni sindrom	Feltyjev sindrom, SLE, antifosfolipidni sindrom, Sjogrenov sindrom, sistemska skleroza
<b>Okužbe</b>	HIV, EBV, CMV, VZV, HCV, TBC, Leishmania	HIV, HBV, HCV, EBV, CMV, Parvo B19	EBV, TBC, H. pylori
<b>Imunske pomanjkljivosti</b>	CVID	CVID	CVID
<b>Transfuzije, presaditve</b>	Predhodna transfuzija, PKMC, presaditev solidnega organa	Predhodna PKMC	
<b>Druge avtoimunske bolezni</b>		Gravesova bolezen	Gravesova bolezen

## Viri

1. Brierley CK, Pavord S; Autoimmune cytopenias and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Clin Med*. 2018 Aug;18(4):335-339. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-4-335> PMID:30072561
2. Hill QA, Stamps R, Massey E, Grainger JD, Provan D, Hill A; British Society for Haematology. The diagnosis and management of primary autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol*. 2017 Feb;176(3):395-411. <https://doi.org/10.1111/bjh.14478> PMID:28005293
3. Košnik M, Štajer D, Jug B, Kocjan T, Koželj M. *Interna medicina, šesta izdaja*. Ljubljana: založba Buča; 2022
4. Provan D, Arnold DM, Bussel JB, Chong BH, Cooper N, Gernsheimer T, et al.; Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood Adv*. 2019 Nov;3(22):3780–3817. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000812>
5. Song F, Al-Samkari H. Management of Adult Patients with Immune Thrombocytopenia (ITP): A Review on Current Guidance and Experience from Clinical Practice. *J Blood Med*. 2021 Jul;12:653-664. doi: 10.2147/JBM.S259101 PMID: 34345191
6. Newburger PE. Autoimmune and other acquired neutropenias. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016 Dec;2016(1):38-42. doi: 10.1182/asheducation-2016.1.38 PMID: 27913460
7. Palmblad J, Nilsson CC, Höglund P, Papadaki HA. How we diagnose and treat neutropenia in adults. *Expert Rev Hematol*. 2016 May;9(5):479-487. doi: 10.1586/17474086.2016.1142867 PMID: 26778239

## Imunihematološko testiranje pri avtoimunskih hemolitičnih anemijah (DCT+ in DCT-)

*Marjeta Maček Kvanka*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*marjeta.macek@ztm.si*

### Izhodišča

Avtoimunska hemolitična anemija (AIHA) je dekompenzirana pridobljena hemoliza, ki je posledica delovanja bolnikovega imunskega sistema proti lastnim eritrocitnim antigenom [1]. Direktni Coombsov (antiglobulinski) test (DCT), s katerim ugotavljamo na eritrocite vezane imunoglobuline (Ig) in komponente komplemента, ostaja najpomembnejši serološki test za diagnozo AIHA. Z indirektnim Coombsovim (antiglobulinskim) testom (ICT) pri teh bolnikih presejalno ugotavljamo prisotnost prostih avtoprotiteles (avtoPt) v plazmi. Prisotnost eritrocitnih avtoprotiteles (avtoPt) lahko vodi do skrajšanega preživetja eritrocitov. Glede na serološke rezultate imunohematoloških (IH) preiskav se AIHA razvršča v 4 tipe: AIHA s toplimi protitelesi (65%), AIHA s hladnimi protitelesi, bolezen zaradi hladnih aglutininov (29%) in paroksizmalna hemoglobinurija zaradi ohladitve (1%) ter mešani tip AIHA (5%). Pred desetletji je AIHA z negativnim DCT (DCT-) predstavljala dodatno skupino primerov AIHA. Vsi naštetni tipi AIHA lahko potekajo idiopatsko (primarna AIHA) ali v sklopu nekaterih drugih bolezni, zdravil ali okužb (sekundarna AIHA). V določenih primerih hemolitičnih anemij zaradi zdravil so vpletena od zdravil neodvisna eritrocitna avtoprotitelesa, ki jih glede na serološke rezultate ne moremo ločevati od AIHA s toplimi protitelesi.

Pred uvedbo občutljivejše gelske tehnike testiranja sredi 90. let prejšnjega stoletja, ki je nadomestila standardno testiranje DCT v epruveti, je AIHA (DCT-) predstavljala 5-10% primerov. Opisani so trije možni vzroki, ki so prevladujoče vezani na standardno testiranje DCT v epruveti:

1. število molekul Ig vezanih na eritrocit je pod mejo zaznave testiranja (DCT v epruveti zazna okrog 200, DCT v gelski tehniki 100 molekul/ eritrocit)
2. protitelesa so vezana z nizko afiniteto (pri DCT v epruveti se med postopki pranja izgubijo)
3. za DCT v epruveti se uporablja le specifične reagentne anti-IgG in anti-C3d (manjkajo drugi specifični reagenti npr. anti-IgA in anti- IgM)



V Sloveniji že skoraj 3 desetletja rutinsko uporabljamo gelsko tehniko testiranja eritrocitnih IH preiskav, zato so pričakovano primeri AIHA (DCT-) maloštevilni, vendar njihovega natančnega števila ne poznamo. V literaturi navajajo pri testiranju v gelski tehniki AIHA DCT- v 3%.

Pri primerih suma na AIHA DCT- je pred uvedbo zdravljenja s kortikosteroidi na eni strani treba izvesti občutljivejše IH teste, na drugi pa mora lečeči zdravnik diferencialno diagnostično izključiti alternativne vzroke hemolitične anemije (prirojene in pridobljene imunske / neimunske).

Priporočila za diagnostično obravnavo AIHA DCT- so:

1. uporaba gelske tehnike testiranja z monospecifičnimi reagenti anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA, anti-C3c, anti C3d
2. testiranje eluata
3. testiranje z encimi
4. uporaba občutljivejših testov npr. s pretočnim citometrom ali radioimunskih testov (zaznava 78,5 molekul / eritrocit) ipd.

Z izjemo občutljivejših komplementarnih testov (točka 4) v Sloveniji že sedaj lahko sledimo navedenim priporočilom. Problem pa so pomanjkljive informacije o pacientu, saj pogosto od lečečih zdravnikov ne prejmemo podatkov kot so diagnoze, transfuzijska anamneza ali klinični potek. Dodatne IH preiskave lahko izvajamo le, kadar smo s strani klinika opozorjeni na primer klinične hemolize z DCT-.

Imunohematološke preiskave za diagnostiko AIHA, ob prevladujoči odsotnosti diagnoz, večinoma izvajamo zaradi reaktivnosti, ki jo ugotovimo pri presejalnih DCT in ICT. Na eni strani so usmerjene v diagnostiko tipa AIHA in odkrivanje lastnosti avtoPt, na drugi pa v odkrivanje prisotnosti prikritih aloprotiteles (aloPt), kar je ključnega pomena za zagotavljanje skladnih eritrocitov za transfuzijo. V prispevku so prikazani nekateri rezultati imunohematološkega testiranja bolnikov z AIHA na Zavodu RS za transfuzijsko medicino v letih 2006-2022.

### **Imunohematološke preiskave**

Rutinsko jih izvajamo v gelski tehniki. Serološki dokaz prisotnosti avtoPt običajno pridobimo z DCT, pri čemer lahko uporabimo monospecifične reagentne reagenti anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA, anti-C3c, anti-C3d. Sledijo postopki eluiranja avtoPt iz eritrocitov in ugotavljanje prisotnosti oz. specifičnosti odkritih avtoPt v eluatu. Prosta avtoPt razreda IgG v plazmi odkrivamo z ICT. Pri pozitivnem ICT nadaljujemo z ugotavljanjem specifičnosti avtoPt.

Pri sumu na prisotnost hladnih avtoPt (npr. težave pri orientacijski določitvi KS) ali kadar je DCT pozitiven zaradi C3 je potrebno orientacijsko določiti reaktivnost hladnih aglutininov (razred IgM) na sobni temperaturi, kar izvajamo v epruveti. Če so prisotni, določimo temperaturni optimum hladnih aglutininov z ugotavljanjem njihovega titra pri temperaturah +4 °C, +20 °C, +30 °C in +37 °C. Klinično so pomembni le hladni aglutinini s termalno amplitudo  $\geq 30$  °C. Pri teh primerih priporočimo transfundiranje eritrocitov ogretyh na 37 °C. Pri sumu na paroksizmalno hladno hemoglobinurijo (redki primeri, prevladujoče pri otrocih z virusnimi okužbami) izvedemo Donath-Landsteinerjev test, s katerim specifično dokažemo prisotnost bifaznega hemolizina.

Bolnikom z AIHA običajno že pri prvi obravnavi rutinsko določimo poleg rutinske krvne skupine ABO, RhD in K še vsaj fenotip Rh in druge najpogostejše klinično pomembne antigene (Ag): Jk<sup>a/b</sup>, Fy<sup>a/b</sup>, Ss, M. Če s serološkimi testiranjem ne pridemo do zanesljivih rezultatov ali kadar je bolnik pred testiranjem prejel transfuzije se odločimo za genotipizacijo eritrocitnih Ag iz genske DNK. Rutinsko zaradi odsotnosti monoklonskega reagenta anti-Fya z genotipizacijo določamo Ag Fy<sup>a</sup>.

Pri bolnikih z AIHA posebno pozornost zahteva odkrivanje prisotnosti aloPt. Kljub zamudnosti postopkov, s katerimi odstranjujemo prisotnost avtoPt, moramo predvsem pri bolnikih z anamnezo predhodnih transfuzij in nosečnosti sistematično odkrivati in izključevati prisotnost aloPt usmerjenih proti antigenom DCcEe, Kk, Jk<sup>a/b</sup>, Fy<sup>a/b</sup>, Ss in M. Našteta aloPt so klinično pomembna in lahko v primerih transfuzije neskladnih eritrocitov pospešijo hemolizo, ki že sicer lahko poteka pri teh bolnikih.

Za odstranjevanje avtoPt iz plazme bolnika izvajamo postopke adsorbcije plazme na avtologne eritrocite, na alogenske, ki so identični z bolnikovimi v klinično pomembnih Ag ali postopke diluiranja plazme. Imunohematološko testiranje se običajno zaključí z izbiro enot eritrocitov za transfuzijo. Večini bolnikov zaradi prisotnosti panaglutininirajočih avtoPt v plazmi ne moremo zagotoviti eritrocitov z negativnimi navzkrižnimi preizkusi. Pri izbiri darovalcev obvezno upoštevamo specifičnosti odkritih aloPt, ne pa avtoPt. Upoštevanje specifičnosti avtoPt je omejeno na primere hude hemolize, ko z izbiro eritrocitov skladnih z avtoPt poskušamo doseči blažji potek hemolize. Dodatno zaradi varnosti in preventive senzibilizacij bolnikom z AIHA rutinsko zagotavljamo eritrocite skladne vsaj v fenotipu Rh in K, večini pa v okviru razpoložljivih enot tudi v drugih najpogostejših klinično pomembnih Ag.

Po zaključku vseh preiskav rezultate kliniku povzamemo in interpretiramo v zaključnem mnenju. V njem klinike tudi opozorimo na posebne ukrepe, kot je npr. segrevanje eritrocitov, in na zamudnost IH testov in iskanja razširjeno antigensko skladnih enot, ki lahko traja tudi več ur ali dni.

## Rezultati

V letih 2006-2022 smo na Zavodu RS za transfuzijsko medicino obravnavali od 36 do 75 (povprečno 61) pacientov, ki so imeli serološke rezultate skladne z AIHA, na leto. Prevladovali so pacienti s prostimi panspecifičnimi avtoPt, plazemska avtoPt določenih specifičnosti smo ugotovili pri 8,2 do 21,4 % (v povprečju 14,2%) pacientov. Hkratno prisotnost avtoPt in aloPt v plazmi smo ugotovili pri 9,4 do 25% (v povprečju 16,1%) obravnavanih pacientov z AIHA (Tabela 1). Najpogosteje smo ugotovili aloPt usmerjena proti Ag iz sistema Rh in K. Pri 22,4% vseh aloimuniziranih pacientov smo dokazali kombinacijo dveh ali več aloPt.

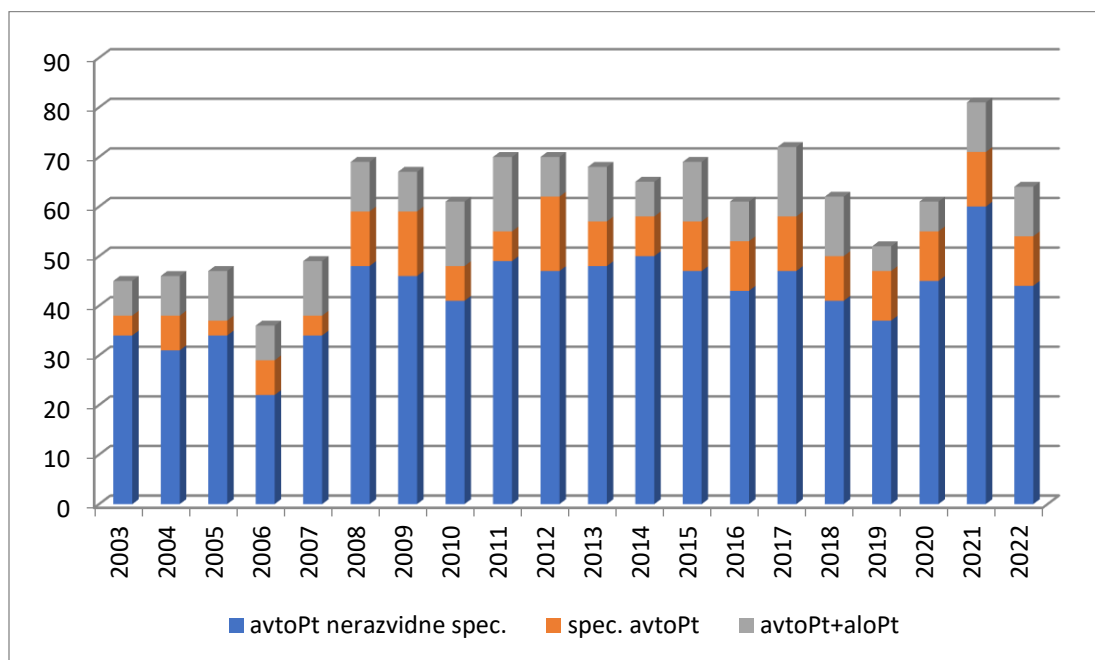


Tabela 1 prikazuje število obravnavanih pacientov z AIHA v letih 2003-2022, pri katerih smo ugotovili panspecifična avtoPt, avtoPt določene specifičnosti in avtoPt v kombinaciji z aloPt.

## Zaključki

Imunohematološka diagnostika pri bolnikih z AIHA nam omogoča s proučevanjem lastnosti avtoPt ugotoviti tip AIHA, z odkrivanjem aloPt pa zagotavljanje z aloPt skladnih eritrocitov. Kljub zamudnosti postopkov moramo odkrivanje prikritih in izključevanje potencialnih aloPt izvajati sistematično, saj smo jih dokazali pri 16,1% vseh pacientov z AIHA. Pri izbiranju enot KE za transfuzijo se poslužujemo različnih pristopov, ki ne smejo odložiti nujnih transfuzij. S preventivnim izdajanjem eritrocitov identičnih s pacientovimi v klinično pomembnih Ag

preprečimo hemolizo pri senzibiliziranih pacientih oziroma preprečujemo nove senzibilizacije. V nujnih primerih izdajamo eritrocite skladne le v ABO, RhD, K in fenotipu Rh.

### Viri

1. Hill QA, Stamps R, Massey E, Grainger JD, Provan D, Hill A. The diagnosis and management of primary autoimmune haemolytic anemia. BSH Guidelines 2016
2. Sachs U, Röder L, Santoso S, Bein G. Does a negative direct antiglobulin test exclude warm autoimmune haemolytic anaemia? A prospective study of 504 cases. *British Journal of Haematology* 2006; 132: 655-6
3. Kamesaki T. Diagnostic algorithm for classification and characterization of direct antiglobulin test-negative autoimmune haemolytic anemia with 1-year clinical follow-up. *Transfusion* 2022; 62: 205-16

## Izguba antigena RhD

Sanja Sobočan Koša, Primož Rožman

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

sanja\_sobocan-kosa@ztm.si

### Uvod

Krvnoskupinski sistem Rh je za sistemom ABO klinično drugi najpomembnejši. Kodirata ga dva evolucijsko visoko homologna gena *RHD* in *RHCE*, ki izražata dva proteina RHD in RHCE. Celoten sistem Rh zajema 56 eritrocitnih antigenov (Ag), med njimi je zaradi svoje izjemne imunogenosti klinično najpomembnejši antigen D, sledijo mu antigeni C, c, E in e. Posamezniki, ki nimajo alela z zapisom *RHD*, so RhD-negativni in se zato lahko senzibilizirajo na RhD antigen ob neskladni transfuziji krvi, predhodni nosečnosti ali transplantaciji. Protitelesa anti-D so klinično pomembna, saj lahko povzročijo hemolitično transfuzijsko reakcijo, pri nosečnicah pa hemolitično bolezen ploda in novorojenca. Pravilna določitev prisotnosti ali odsotnosti Ag RhD na eritrocitih preiskovanca je zaradi tega izjemno pomembna. Prispevek opisuje izgubo Ag RhD pri bolniku, ki je posledica izgube heterozigotnosti za gen *RHD* in pojav klonalne eritropoeze.

### Osnove genskega izražanja Ag RhD

Gen *RHD* se nahaja tesno skupaj z genom *RHCE* na kratkem kraku kromosoma številka 1, na tako imenovanem lokusu *RH*. Gena *RHD* in *RHCE* sta v kodirajoči regiji 97 % homologna. Njun genski zapis in gensko izražanje velikokrat interpretiramo kot celoto. Vsak kodira po eno polipeptidno molekulo, ki sta si strukturno in funkcijsko podobni. Gen *RHD* kodira proučevani Ag RhD ali protein D, medtem ko gen *RHCE* kodira Ag RhCcEe, ki lahko nastopa v štirih kombinacijah proteina, to so Ce, ce, cE ali CE. Oba proteina skupaj podajata t.im. fenotip Rh, na podlagi katerega lahko sklepamo o podedovanem haplotipu.

Gen *RHD* je v evoluciji doletela delecija, ki pa ni ogrožala zdravja, ker vrši podobno funkcijo homologni protein RHCE. RhD-negativne osebe so zatorej homozigoti z delecijo *RHD*, katere posledica je popolna odsotnost Ag RhD. Oba gena sistema Rh sta doživela mnogo mutacij, še posebno zaradi svoje visoke homologije, zato obstaja visoko število variant tega sistema.

## Določanje Ag RhD in razreševanje diskrepantnih seroloških rezultatov

Ag RhD rutinsko določamo s serološko metodo aglutinacije in ga opredelimo kot pozitivnega ali negativnega. Pri nekaterih posameznikih pa lahko opazimo istočasno prisotnost tako RhD-pozitivnih kot RhD-negativnih eritrocitov, kar imenujemo dvojnocelična ali mešanocelična populacija. Najpogostejša razloga zanjo sta predhodne transfuzije RhD-neidentičnih eritrocitov in stanje po presaditvi krvotvornih matičnih celic (KMC). V bistvu gre pri tem za transfuzijski ali transplantacijski himerizem, ki je posledica prisotnosti dveh tkiv oz. celičnih linij, ki so nastale iz dveh ali več zigot. V redkih primerih lahko v sistemu Rh opazimo tudi pojav mozaicizma, ki je posledica prisotnosti celičnih linij različnih fenotipov, ki pa so nastale iz ene zigote. Spremenjena krvna skupina je v tem primeru posledica delne ali pa popolne klonalne eritropoeze kot posledice somatske mutacije gena *RHD*.

Na podlagi izsledkov raziskav je najpogostejši mehanizem za pojav klonalne eritropoeze in s tem mozaicizma RhD izguba heterozigotnosti vzdolž variabilnih regij kromosoma 1, ki zajema lokus *RH*. Da bi dokazali slednje, se poslužujemo večstopenjske diagnostike, pri čemer lahko uporabimo različne serološke in molekularne metode, kot so npr:

### 1. Določitev Ag RhD na eritrocitih s serološko metodo aglutinacije

Rutinsko določimo Ag RhD z uporabo različnih monoklonskih protiteles anti-D in lahko dobimo rezultat dvojnocelične populacije.

### 2. Določitev Ag RhD na eritrocitih s pretočno citometrijo

Z izborom monoklonskih protiteles anti-D določimo delež RhD-pozitivnih in RhD-negativnih eritrocitov.

### 3. Določitev antigenov Rh s pretočno citometrijo

S pomočjo pretočno-citometričnega ločevalca in uporabe specifičnih monoklonskih protiteles celice z jedri razvrstimo v različne vrste, podskupine in različne razvojne stopnje. Namen je izolacija različnih klonov eritroidne vrste za nadaljnjo kultivacijo in analizo. S primerjalno analizo krvotvornih celic druge vrste in različnih razvojnih stopenj lahko ugotovimo, na kateri razvojni stopnji se je pojavila genska sprememba oziroma izguba Ag RhD.

#### 4. Vzgojanje kolonij progenitorske celice eritroidne vrste (BFU-E).

Pri tem vzgojimo iz KMC več celičnih linij eritrocitne vrste, njihovo ločevanje na različnih stadijih razvoja ter klonsko ločevanje pa nam omogoči njihovo analizo s pretočno citometrijo, po izolaciji DNK pa še molekularno testiranje.

#### 5. Genotipizacija RHD

Na podlagi izolirane genomske DNK iz posameznih kolonij BFU-E in hematopoetskih celic druge vrste in različne razvojne stopnje opravimo gensko tipizacijo RHD z metodo verižne reakcije s sekvenčno specifičnim prileganjem (PCR) ali s sekvenciranjem. Določimo lahko tudi zgotnost gena RHD.

#### 6. Določanje polimorfizma s pomočjo analize polimorfizmov multiplih genov ali mikrosatelitov

Himerizem lahko določamo načeloma tudi z analizo polimorfizmov različnih genov, razporejenih po celem genomu. Na tak način lahko ugotovimo, ali v krvi obstojajo zapisi za 3 različne alele, v tkivu pa za običajna dva alela nekega gena, kar pomeni da gre za himerizem po transplantaciji. Podobno lahko storimo tudi s primerjalno analizo visoko polimorfni avtosomnih mikrosatelitnih lokusov na DNK, izolirani iz polne krvi in somatskih celic nehematopoetske vrste (npr. epiteljske celice bukalne sluznice), s čimer lahko izključimo prirojeni ali pridobljeni himerizem kot vzrok za pojav klonske eritropoeze. Te metode lahko s ciljanjem na določeno regijo genomske DNK, ki jo izoliramo iz krvi ter različnih somatskih celic uporabimo tudi za dokaz mozaicizma RhD v različnih fazah ontogenetskega razvoja.

#### 7. Fluorescenčna in situ hibridizacija (FISH)

FISH je citogenetska metoda, ki omogoča določanje prisotnosti ali odsotnosti specifičnih sprememb na kromosomih, vključno z delecijami, rekombinacijami in duplikacijami, ki lahko povzročijo izgubo heterozigotnosti za gen RHD. V primerjavi z molekularnimi metodami je ta metoda dosti manj občutljiva.

### **Klinična stanja povezana s pridobljeno izgubo antigena RhD**

Izguba Ag RhD je bila v literaturi že večkrat opisana pri bolnikih s hematološkimi obolenji, kot so akutna ali kronična levkemija mieloidne vrste, mielodisplastični sindrom in mieloproliferativne bolezni. Spontano izgubo Ag RhD so opisali tudi pri zdravih RhD-pozitivnih posameznikih, predvsem starostnikih in bolnikih z nehematološkimi obolenji kot so malignomi in srčnožilna obolenja. Potencialno nevarni so tovrstni krvodajalci, ki imajo zaradi te konverzije še vedno nezaznavno količino RhD-pozitivnih eritrocitov in lahko zato še vedno povzročijo senzibilizacijo

RhD-negativnih prejemnikov. Seveda so podobni primeri v transfuzijski praksi redki, a jih moramo poznati in upoštevati.

## Sklep

Izguba Ag RhD je redko prepoznano stanje, ki lahko vpliva na klinično vodenje bolnikov in izbiro ustreznega transfuzijskega zdravljenja. Z uporabo seroloških, molekularnih in citogenetskih preiskav lahko natančno opredelimo vzrok za klonsko eritropoezo. Nove študije kažejo na dolgotrajno skupno ontogenezo z drugimi linijami hematopoeze, zlasti mieloidne vrste. Boljše razumevanje hematopoeze na tej ravni ter nadaljnje raziskave v povezavi s klonsko preobrazbo lahko privedejo do novih diagnostičnih in terapevtskih pristopov, morda tudi upočasnitve procesa staranja in z njim povezanih bolezni.

## Viri

1. Dauber EM, Mayr WR, Hustinx H, Schönbacher M, Budde H, Legler TJ, et al. Somatic mosaicisms of chromosome 1 at two different stages of ontogenetic development detected by Rh blood group discrepancies. *Haematologica*. 2019 Mar;104(3):632-638.
2. Fan X, Wu C, Truitt LL, Espinoza DA, Sellers S, Bonifacino A, et al. Clonal tracking of erythropoiesis in rhesus macaques. *Haematologica*. 2020 Jul;105(7):1813-1824.
3. Körmöczí GF, Dauber EM, Haas OA, Legler TJ, Clausen FB, Fritsch G, et al. Mosaicism due to myeloid lineage restricted loss of heterozygosity as cause of spontaneous Rh phenotype splitting. *Blood*. 2007 Sep 15;110(6):2148-57.
4. Peyrard T and Wagner FF. The Rh System. In: Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM, eds. *Technical Manual of the American Association of Blood Banks*. 20th ed. Maryland: AABB; 2020. pp. 629-50.
5. Walsh K, Raghavachari N, Kerr C, Bick AG, Cummings SR, Druley T, Dunbar CE, Genovese G, et al. Clonal Hematopoiesis Analyses in Clinical, Epidemiologic, and Genetic Aging Studies to Unravel Underlying Mechanisms of Age-Related Dysfunction in Humans. *Front Aging*. 2022 Mar 8;3:841796.



## Konzervativni pristop k transfuzijskem zdravljenju

Luka Čemažar<sup>1</sup>, Primož Poženeš<sup>2</sup>

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

2 Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

Luka.cemazar@kclj.si

### Nadomeščanje eritrocitov

Vrednosti v krvni sliki, pri katerih se odločimo za transfuzijsko zdravljenje s pripravki eritrocitov, so se skozi leta spreminjale. Izoblikovala so se številna priporočila, ki nam pomagajo pri odločitvi. Glede na patofiziološki vidik izboljšanja oksigenacije tkiv s transfuzijo eritrocitov, bi bilo moč sklepati o ugodnejšem izhodu za pacienta, ki je prejel transfuzijo eritrocitov prej (višji prazni hemoglobin) in bo imel višjo potransfuzijsko vrednost hemoglobina, v primerjavi z bolnikom, ki je prejel transfuzijo eritrocitov kasneje (nižji prazni hemoglobin) in bo imel nižjo potransfuzijsko vrednost hemoglobina. Ugodnejši izhod bi pričakovali ne glede na bolezensko stanje pri bolniku..

V nasprotju s pričakovanji pa so številne randomizirane študije pokazale, da je varno v določenih okoliščinah vzdrževati vrednost hemoglobina med 70 in 80 g/L, kar je značilno za restriktivni pristop, nasproti t.i. liberalnemu pristopu, pri katerem je prag za transfuzijo pri 100g/L. Poleg vrednosti hemoglobina je potrebno upoštevati indikacije, klinično sliko ter pridružene bolezni, ki vplivajo na potek zdravljenja.

Nadomeščanje eritrocitov pri vrednosti hemoglobina < 70g/L (konservativni ali restriktivni pristop) pride v poštev pri bolnikih, ki so brez simptomov anemije ter so kardiorespiratorno stabilni.

Primeri, kjer se restriktivnega pristopa ne poslužujemo:

- akutni koronarni sindrom oziroma miokardni infarkt. V primeru akutne ishemije ali nestabilnosti je smiselno vzdrževati vrednosti hemoglobina >100g/L. Izkazalo se je, da je v skupini, ki je prejela nadomeščanje po restriktivnem pristopu več kardiovaskularnih dogodkov v prvih 30 dneh.
- akutne krvavitve, kjer se zanašamo na vitalne znake in hemodinamsko stabilnost ter dinamiko stanja bolnika.

- bolniki, ki navajajo simptome anemije v smislu zadihanosti, slabše zmogljivosti in hitrejše utrudljivosti. V ta sklop spadajo tudi bolniki, ki prejemajo kronično nadomeščanje krvnih pripravkov.

Transfuzijsko zdravljenje je na splošno varno, kljub temu pa lahko predstavlja za bolnika določeno tveganje, zato je vedno potreben premislek ali se je možno transfuziji izogniti. Klinično najpomembnejši neželeni učinki transfuzije so volumska preobremenitev (angl. TACO), akutna s transfuzijo povezana poškodba pljuč (angl. TRALI), alergijske in anafilaktične reakcije, obremenitev z železom, prenos bakterijskih in virusnih okužb ter senzibilizacija na eritrocitne antigene. Predvsem TACO, TRALI in anafilaktične reakcije lahko akutno življenjsko ogrozijo bolnika. Poleg klinično jasnih neželenih učinkov je populacija kritično bolnih dodatno ogrožena zaradi diskretnih imunopresivnih in mikrocirkulatornih učinkov transfuzij eritrocitov.

V zadnjih letih so se pojavili številni pristopi, ki zasledujejo restriktivni pristop k transfuziji krvnih komponent. Priporočila ameriškega združenja za hematologijo tako odsvetujejo liberalne transfuzije eritrocitov, kar pomeni, da je potrebno zasledovati najmanjše možno število transfundiranih enot eritrocitov. Pri hospitaliziranih bolnikih, ki niso kardiološki in so stabilni, je cilj olajšanje simptomov anemije ali dvig hemoglobina v varno območje 70-80g/l.

Presenetljivi so bili izsledki študij TRICC in TRISS, kjer so analizirali kritično bolne v intenzivnih enotah ter bolnike s septičnim šokom. Izkazalo se je, da je konservativni pristop varen pri obeh skupinah pacientov.

Za hemato-onkološke bolnike veljalo enaka navodila pri nadomeščanju krvnih pripravkov kot za ostale stabilne paciente in je meja, kjer nadomeščamo eritrocite postavljena med 70-80g/l. Študija DeZerna in sod. je pri bolnikih z akutno levkemijo denimo pokazala, da nižji transfuzijski prag 70g/l v primerjavi z 80g/l ni imel nobenega učinka na trajanje hospitalizacije, simptome anemije ter pojavnost febrilne nevtropenije in krvavitvev.

Omeniti moramo še Cochranovo sistematično študijo iz leta 2021. Zajela 48 kliničnih študij, ki so vključevale 21433 bolnikov, ki so prejeli transfuzije eritrocitov zaradi najrazličnejših indikacij. Zaključek je bil, da obstajajo močni dokazi, da se je mogoče varno izogniti transfuziji eritrocitov pri večini bolnikov, ki imajo vrednost hemoglobina med 70 in 80 g/l, kar z drugimi besedami pomeni, da je restriktivni pristop varen. Obstajajo pa podskupine bolnikov, pri katerih je potrebno vzdrževati višje vrednosti hemoglobina.

### **Nadomeščanje trombocitov**

V primeru hematoloških bolnikov, pri katerih je poleg anemije prisotna huda trombocitopenija, konservativni pristop k nadomeščanja krvnih pripravkov ne pride v poštev, saj so le ti bolj nagnjeni k spontanim krvavitvah. V študiji PLADO so med drugim pokazali, da je vrednost hematokrita, nižja

od 0,25, povezana s povečano verjetnostjo za krvavitev. Po drugi strani pa lahko pri hematoloških bolnikih pride do krvavitve tudi pri višjih vrednostih trombocitov zaradi sočasnih motenj v koagulaciji, nepovezanih z vrednostjo trombocitov, zato samo nadomeščanje trombocitov ne pomeni nujno manjše verjetnosti za nastanek le-te.

Glede na številna priporočila je potrebno s profilaktičnimi transfuzijami koncentriranih trombocitov začeti pri vrednosti nižji od  $10 \times 10^9/l$ . Še posebej so zaradi potencialnih krvavitve ogroženi bolniki z akutno levkemijo. V kliničnih študijah se je izkazalo, da so imeli krvavitve višje stopnje (stopnja 3 ali 4 po WHO) tisti bolniki z akutno mieloidno levkemijo, ki niso dobivali profilaktičnih transfuzij trombocitov in so imeli vrednosti trombocitov pod  $10 \times 10^9/l$ .

V prid restriktivnemu pristopu pri transfuzijah trombocitov govorijo rezultati dveh kliničnih študij bolnikov z akutno levkemijo (Heckman in Rebulla), ki nista ugotovili statistično pomembnih razlik v pojavnosti krvavitve med skupino bolnikov, ki je prejela transfuzije trombocitov pri vrednosti trombocitov  $20 \times 10^9/L$  in skupino bolnikov, ki je prejela transfuzije pri vrednosti  $10 \times 10^9/L$ . Še vedno veljajo priporočila o nadomeščanju pri vrednosti trombocitov  $<100 \times 10^9/L$  v primeru nevrokirurških ali okulističnih posegov, pri večji operaciji  $<50 \times 10^9/L$  pri laparoskopskih operacijah med  $30-50 \times 10^9/L$  ter pri manj invazivnih posegih med  $20$  in  $30 \times 10^9/L$ .

## Zaključek

Konservativni (restriktivni) pristop k transfuziji eritrocitov je bil potrjen v mnogih kliničnih študijah in je varen. Pozorni morami biti na skupine bolnikov, pri katerih je oksiformna kapaciteta krvi ključna za ugoden izhod zdravljenja (akutni koronarni sindrom, nestabilni krvaveči bolniki, simptomatski bolniki) in pri njih indicirati transfuzije eritrocitov prej – pri višjih vrednostih hemoglobina. Pri bolnikih, ki potrebujejo profilaktične transfuzije trombocitov je potrebno izpostaviti bolnike z akutno levkemijo, pri katerih moramo dosledno vzdrževati vrednost trombocitov nad  $10 \times 10^9/L$ .

## Viri

1. Hans Van Remoortel, Emmy De Buck, Tessa Dieltjens et al. Methodologic quality assessment of red blood cell transfusion guidelines and the evidence base of more restrictive transfusion thresholds
2. DeZern AE, Williams K, Zahurak M, et al. Red blood cell transfusion triggers in acute leukemia: a randomized pilot study. *Transfusion* 2016; 56: 1750- 7.
3. Lisa K Hicks<sup>1</sup>, Harriet Bering, Kenneth R Carson, The ASH Choosing Wisely® campaign: five hematologic tests and treatments to question. *Blood* (2013) 122 (24): 3879–3883.

4. Jeffrey L Carson , Simon J Stanworth , Jane A Dennis et al. Transfusion thresholds for guiding red blood cell transfusion. Cochrane Database Syst Rev 2021 Dec 21;12(12):CD002042.
5. Stanworth SJ, Estcourt LJ, Powter G, et al. A no-prophylaxis platelet-transfusion strategy for hematologic cancers. N Engl J Med 2013;368:1171-80. (študija TOPPS)
6. Heckman KD, Weiner GJ, Davis CS, et al. Randomized study of prophylactic platelet transfusion threshold during induction therapy for adult acute leukemia: 10,000/mL versus 20,000/mL. J Clin Oncol 1997;15:1143-9
7. Rebutta P, Finazzi G, Marangoni F, et al. The threshold for prophylactic platelet transfusions in adults with acute myeloid leukemia. N Engl J Med 1997;337:1870-5
8. Lynne Uhl, Susan F. Assmann, Taye H. Hamza, et al. Laboratory predictors of bleeding and the effect of platelet and RBC transfusions on bleeding outcomes in the PLADO trial Blood. 2017 Sep 7; 130(10): 1247–1258
9. Lars B Holst <sup>1</sup>, Nicolai Haase, Jørn Wetterslev et al. Lower versus Higher Hemoglobin Threshold for Transfusion in Septic Shock N Engl J Med . 2014 Oct 9;371(15):1381-91 Triss trial
10. Paul C. Hébert, George Wells, Morris A. Blajchman et al. A Multicenter, Randomized, Controlled Clinical Trial of Transfusion Requirements in Critical Care Tricc trial

## AVTOMATIZACIJA LABORATORIJSKIH PREISKAV (ZTMS)

### Popolna avtomatizacija predtransfuzijskih preiskav – izkušnje ZTM

*Ivica Marić*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*ivica.maric@ztm.si*

Predtransfuzijske preiskave so z zakonom opredeljeni obvezni testi, ki jih moramo izvesti pred transfuzijo krvnih komponent. Za zdravljenje bolnikov na letni ravni v Sloveniji izdamo približno 100.000 enot krvnih komponent, od tega več kot 45% na ZTM Ljubljana. Glede na število izdanih enot je Odsek za predtransfuzijske preiskave ZTM največji imunoematološki (IH) laboratorij v državi. Popolna avtomatizacija preiskav je cilja vsakega laboratorija, saj se posledično izboljšata varnosti in sledljivost preiskav/rezultatov. Moderni IH analizatorji po prednastavljenih algoritmičnih interpretirajo rezultat, ki ga uporabnik bodisi potrdi ali zavrne, kar predstavlja dodatno stopnjo varnosti, saj se zmanjša možnost človeške napake. Vrsto let smo se trudili avtomatizirati predtransfuzijske preiskave na ZTM, vendar so posebnosti obstoječega informacijskega sistema (IS), našega načina testiranja ter laboratorija predstavljali velik izziv.

Odločili smo se, da raziščemo ponudbo na tržišču ter eventualno testiramo potencialne IH analizatorje. Konec leta 2017 smo v poskusno testiranje dobili analizator podjetja Ortho, kasneje so še ostala podjetja ponudila v testiranje svoje analizatorje, tako da smo do konec leta 2018 testirali 5 različnih analizatorjev 3 ponudnikov (Ortho, BioRad in Grifols). V letu 2019 smo izvedli javno naročilo (JN) za najem IH analizatorjev s potrošnim materialom in reagenti. Vse ponudbe so ustrezale zahtevam JN. Vsi trije ponudniki so predvideli 2 analizatorja velikega formata za namene predtransfuzijskega testiranja, kar so izračunali na podlagi posredovanih podatkov glede obsega, količine testiranja, števila vzorcev ter dnevnih nihanj. Izbrali smo najugodnejšega ponudnika, in sicer podjetje Mediline, ki je zastopnik proizvajalca Grifols. Podpisu pogodbe konec leta 2019 je sledilo razreševanje obstoječih ovir, saj smo morali optimizirati način testiranja, ukiniti navzkrižni preizkus v tehniki z encimom (eM) ter poiskati IT rešitev glede povegljivosti IH analizatorjev in obstoječega IS.

## Razreševanje povezljivosti

Pred začetkom uporabe analizatorjev Erytra, smo morali razrešiti težavo povezljivosti med analizatorjem in obstoječim IS. V zahtevah v JN smo predvideli, da mora ponudnik vzpostaviti povezavo med analizatorjem in transfuzijskim IS, kar je predstavljalo velik izziv, saj IS, ki ga uporabljamo, ni sodoben. S pomočjo zunanjega izvajalca in sodelovanja ZTM je ponudnik uspel preko vmesnika povezati analizatorje in IS. Namen vmesnika je »prevod« iz Grifols kode v Datec kodo. Izdelava in postavitve vmesnika sta trajali skoraj 1 leto. Pred vpeljavo v rutinsko delo smo obsežno validirali delovanje vmesnika in konec leta 2020 prevzeli analizatorja v uporabo. V JN smo predvideli samo enosmerno povezljivost (analizator → IS) za prenos rezultatov, kar pomeni ročni vnos naročila v analizator in avtomatski prenos rezultata v IS. Ker tak način dela ni varen, saj predstavlja izjemno visoko možnost človeške napake, zlasti v laboratoriju s tako visoko obremenitvijo, smo se odločili za nadgradnjo vmesnika na dvosmerno komunikacijo (IS → analizator → IS), kar pomeni IS posreduje naročilo v analizator, ki po zaključenem testiranju posreduje rezultat v IS. Nadgradnja vmesnika je za dodatne 4 mesece zavlekla izvedbo avtomatiziranih IH preiskav. V drugi polovici aprila 2021 smo pričeli z izvedbo navzkrižnega preizkusa s pomočjo dvosmerne komunikacije vmesnika.

## Ukinitev navzkrižnega preizkusa v tehniki z encimom

Že pred avtomatizacijo predtransfuzijskih preiskav je obstajala namera o ukinitvi eM, saj smo pogosto zaznali klinično manj pomembna protitelesa, ki so bila reaktivna samo v tehniki z dodatkom encima (NaCl-e). Nespecifična reaktivnost v encimu (NRE) je podaljševala čas testiranja in posledično izdaje krvnih komponent ter zviševala stroške testiranja. Z avtomatizacijo IH preiskav smo bili primorani ukiniti eM, saj izbrani analizator ne podpira izvedbe eM. Za namene natančnejše razjasnitve protiteles, smo v prehodnem šestmesečnem obdobju presejano testirali vse prejemnike eritrocitov s papainiziranimi eritrocitnimi testnimi celicami (IT-P) ter dodatno specificirali protitelesa, reaktivna samo v tehniki z encimom. V petmesečnem obdobju smo izvedli 4972 testov IT-P, od tega jih je bilo pozitivnih (IT-P poz, ICT neg) 489 (9,8%). Med vsemi pozitivnimi rezultati je bilo le 25 takih, ki so imeli razvidno specifičnost, in sicer 14 primerov protiteles anti-E, 4 anti-C<sup>w</sup>, 4 anti-Le<sup>a</sup>, 1 anti-Le<sup>b</sup>, 1 anti-P1 ter 1 anti-Lu<sup>a</sup>. Zaključili smo, da višja občutljivost testiranja pripomore k odkrivanju več bolnikov s protitelesi, ki pa so bodisi naravno prisotna ali pa klinično manj pomembna. Po uspešno zaključenem petmesečnem prehodnem obdobju smo varno ukiniteli eM in IT-P iz rutinskega testiranja. Do današnjega dne nismo zaznali primera odložene hemolitične reakcije zaradi ukinitve eM.

### **Ukinitev potrjevanja krvne skupine donacije (ABO in RhD) v sklopu NP**

Posebnost našega načina testiranja je bila, da smo vsakič potrdili krvno skupino (ABO in RhD) donacije v sklopu NP, kar je predstavljalo težavo pri avtomatizaciji NP, saj se rezultat potrditve krvne skupine donacije nikamor ne vpisuje. Pravega vzroka za vzpostavitev tega varnostnega mehanizma ni nihče poznal, vendar naj bi bil povezan z napakami pri prenosu rezultata KS donacije med IS za testiranje krvodajalcev in IS za testiranje bolnikov. Za obdobje zadnjih 20 let (2000-2020) smo preverili napake pri določitvi KS donacije in ugotovili, da ni bilo primera napačne določitve KS ali napake pri prenosu KS krvodajalca/donacije. Zaključili smo, da lahko varno ukinejo potrjevanje krvne skupine pri donaciji v sklopu NP.

### **Ukinitev testa avtokontrole (AK) v sklopu NP**

Ker je kapaciteta analizatorja zelo omejena, smo optimizirali izvajanje predtransfuzijskih preiskav, saj vsak (nepotreben) test dodatno obremeni analizator in podaljša čas testiranja. Po dolgem premisleku smo se odločili, da test AK pri večini bolnikov ne predstavlja pomembnega testa, zato smo ga ukini iz rutinskega testiranja v sklopu NP.

### **Optimizacija delovnega procesa**

Avtomatizacija predtransfuzijskih preiskav ne pomeni dobesedne preslikave ročnega dela v avtomatizirani način, ampak zahteva številne prilagoditve. V primerjavi z ročnim delom je poleg spremenjenega načina izvedbe testa, spremenjen način validacije rezultatov, izdaje izvidov, preverjanja ustreznosti krvnih komponent, itd. Vpeljali smo številne izboljšave IS, predvsem dodali dodatne varnostne mehanizme in zapore, ki preprečujejo izdajo neskladnih enot, nepotrjenih rezultatov testiranja, preverjanje skladnosti enot na več ravneh, itd. Ravno tako smo prilagodili izvajanje internih kontrol.

### **Zaključek**

Avtomatizacija predtransfuzijskih preiskav je zelo zahteven in dolgotrajen proces. Zahteva dobro poznavanje delovnih procesov in principov IH testiranja. Vsak proces ima svoj potek dela. Spoznavanje z »novo« tehnologijo, uporabe novih gelskih kartic, z naborom drugačnih testov kot smo jih vajeni, z novimi kloni, in še spoznavanje analizatorja zahteva svoj čas. Vse zaplete smo

sproti reševali. Zaradi visokih standardov in zahtev na področju predtransfuzijskega testiranja so se z vpeljavo rešitve velikokrat odprli novi zapleti. Tudi če smo se še tako trudili, vseh možnih zapletov nismo mogli predvideti. Ključni sta bili potrpežljivost in sodelovanje. Z obsežnim delom, ki smo ga opravili na ZTM Ljubljana ter pridobljenimi izkušnjami, smo omogočili avtomatizacijo IH preiskav tudi drugim transfuzijskim ustanovam v Sloveniji.



## Avtomatizacija imunohematoloških preiskav v laboratoriju za prenatalne preiskave (izkušnje ZTM)

*Ajda Mihorič, Mateja Pipuš, Irena Bricl, Ivica Marić*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*ivica.maric@ztm.si*

Zaradi povečanega števila preiskav in dotrajanosti laboratorijskih aparatov Swing in Saxo, ki sta omogočala polavtomatsko testiranje omejenega števila vzorcev (18+kontrola), se je pokazala potreba po vzpostavitvi avtomatiziranega sistema za izvedbo imunohematoloških preiskav v nosečnosti in po porodu.

Avtomatiziran sistem nam zagotavlja popolno pozitivno identifikacijo in sledljivost testiranih vzorcev in uporabljenih reagentov, diluentov, ID gelskih kartic, kontrol kakovosti, izvajalcev in potrjevalcev rezultatov ter prenos potrjenih rezultatov v naš informacijski sistem (IS Datec).

Leta 2013 je bil na našem tržišču na razpolago laboratorijski sistem IH-1000 (DiaMed danes BioRad), ki je imel popolnoma avtomatiziran sistem za ID-kartice z možnostjo neprekinjenega dodajanja vzorcev in reagentov. Sam laboratorijski aparat sestavlja predel za reagente in vzorce, predel za luknjanje kartic in skladiščenje delno izrabljenih kartic, predel za pipetiranje in dve neodvisni roki za pipetiranje, inkubator, 3 centrifuge, predal za zalogo ID-kartic, predal s posodami za dekontaminacijsko, 2x sistemsko in 2x odpadno tekočino ter koš za porabljene ID-kartice in integriran zaslon na dotik ter 2 integrirana računalnika. Sistem dopolnjuje še programska oprema IH-Com in IH-Client. Sistem ima kapaciteto za 180 vzorcev, 240 ID-kartic (do 20 različnih) in 28 reagentov. Omogoča polnjenje/odstranjevanje tekočin med procesom. Omogoča prednostno testiranje nujnih vzorcev (STAT funkcija). Ima integrirano lastno varnostno kopiranje podatkov, kar omogoča hitro in nemoteno obdelovanje vzorcev.

Omogoča tudi uporabo majhnih pediatričnih vzorcev (500 µl). Vedno imamo vpogled v zalogo reagentov in ID-kartic.

IH-Com je programska oprema za upravljanje s podatki in interpretacijo rezultatov. Ima integriran in nastavljen modul za nadzor nad kontrolami kakovosti za posamezne reagente, diluente in ID-kartice, ki opozarja uporabnika na datum izteka posamezne kontrole.

Validacija rezultatov lahko poteka avtomatsko, v enem koraku in kot v našem primeru na principu dveh parov oči.

Pred integracijo laboratorijskega sistema IH-1000 sta bili potrebni kvalifikacija in validacija. In sicer po protokolu kvalifikacije opreme, kjer smo potrdili ustreznost delovanja v delovnem okolju, ocenili skladnost z našimi zahtevami in pričakovanji (pravilnost, hitrost in kvaliteta izvedbe IH preiskav), povezava IH-Com z IS Datec ter po protokolu validacije procesa, kjer smo vzporedno testirali 300 vzorcev z aparatom Swing (pipetiranje) in Saxo (čitalec). Preverjali smo, če so bili rezultati skladni. Dodatno je sistem uspešno izvedel preiskave iz majhne količine vzorcev (pediatrični vzorci) in iz popkovnične krvi. Z vzporedno izdajo izvidov v testnem programu IS Datec smo preverili prenos v IS Datec in delovanje algoritmov (priporočila glede preventivne zaščite z Ig anti-D). Konec leta 2013 je potekalo še šolanje vseh uporabnikov s strani serviserja DiaHem.

Leta 2014 smo začeli uporabljati nov sistem, ki je zamenjal polavtomatski sistem, pri katerem je aparat Swing pipetiral vzorce in reagente, nato smo jih ročno inkubirali in centrifugirali ter kartice vstavljali v čitalec ID-kartic Saxo za prvo interpretacijo s strani lab. inž. ter prenos rezultatov v IS Datec. Sledil je prenos kartic v stojala za končno interpretacijo in validacijo s strani transfuziologa. Polavtomatski sistem smo uporabljali samo za redne preiskave z zadostno količino vzorca. Vendar je bil že integriran prenos rezultatov iz polavtomatskega sistema v IS Datec pomemben korak k popolni avtomatizaciji.

Popolnoma avtomatiziran sistem za ID-kartice smo uspešno integrirali v delo v laboratoriju za prenatalne preiskave. Danes ga uporabljamo tako za redne kot nujne preiskave, vzorce popkovnične krvi ter pediatrične vzorce. Ročno izvajamo le še preiskave, ki jih na avtomatiziran način ni možno.

V sklopu imunohematološke (IH) prenatalne diagnostike določamo krvno skupino ABO/D in K pri nosečnicah in novorojenčkih po porodu, izvajamo presejalno testiranje na nepričakovana eritrocitna protitelesa (ICT) v začetku nosečnosti in v 26. tednu nosečnosti pri D-negativnih nosečnicah, ki nosijo D-pozitiven plod, preverjamo prisotnost na eritrocite vezanih protiteles pri novorojencih (DCT), podajamo oceno obsega fetomaternalne krvavitve (FMK) po porodu ter spremljamo na eritrocitne antigene senzibilizirane nosečnice z rednimi kontrolami titra protiteles. Od oktobra 2018 izvajamo nacionalni program ciljane zaščite D-negativnih nosečnic na podlagi prisotnosti plodovega gena *RHD* v periferni krvi matere. Preiskave v laboratoriju izvajamo v rednem delovniku od ponedeljka do petka.

**Tabela 2: število opravljenih avtomatiziranih prenatalnih IH preiskav v obdobju 1.1.2014-31.12.2022 (povzeto po IS Datec)**

<b>Preiskava</b>	<b>Število opravljenih storitev</b>
Določitev krvne skupine ABO/D	64.221
Določitev antigena D	23.482
Določitev antigena K	57.315
Indirektni Coombosov test	113.048
Direktni Coombosov test	10.191

### **Zaključek**

Z avtomatizacijo preiskav se poveča sledljivost opravljenih storitev, izboljša se izkoristek reagentov ter optimizira se delo v laboratoriju. Prehod iz ročnega na avtomatiziran način izvajanja preiskav zahteva natančen protokol validacije, spremljanje številnih kazalnikov kakovosti ter natančno poznavanje strokovnega področja in delovnih procesov v laboratoriju. Že skoraj deset let izvajamo avtomatizirane prenatalne IH preiskave. V tem obdobju nismo zaznali napak ali odklonov v delovanju IH analizatorja, kar govori v prid varnosti in robustnosti avtomatiziranega sistema. Vseh preiskav ni mogoče avtomatizirati. Naš kratkoročni cilj je avtomatizirano izvajanje titracije protiteles ter nadgradnja informacijskega sistema.

## ERITROCITI (HLZ)

Eritrocitna vrsta in njeno vrednotenje v mikroskopskem pregledu krvnega razmaza

*Helena Podgornik*

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

*helena.podgornik@kclj.si*

Pod pojmom mikroskopski pregled krvnega razmaza praviloma razumemo predvsem diferenciacijo in oceno levkocitne vrste, medtem ko je vrednotenje ostalih dveh vrst, eritrocitne in trombocitne, pogosto zapostavljeno in prepuščeno izkušeni pregledovalca. Vendar je mikroskopski pregled eritrocitne vrste, ki vključuje prepoznavanje sprememb v velikosti, obliki, razporeditvi, obarvanosti eritrocitov ter prisotnost vključkov v njih, zelo pomembno tudi za prepoznavanje nekaterih ogrožajočih kliničnih stanj. Nekatera odstopanja v eritrocitni vrsti sodijo celo med kritične najdbe.

Priporočila o mikroskopskem vrednotenju razmaza krvi Slovenskega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM, 2012) so poenotila terminologijo za posamezne morfološke spremembe in tudi izrazoslovje za opisovanje teh sprememb. Tako v mednarodnem prostoru kot pri nas je njihovo ocenjevanje semikvantitativno, večinoma tri do štiristopenjsko in kot tako med laboratorijsko slabo primerljivo. Še več, tudi znotraj laboratorijsko je zelo odvisno od izkušenj in presoje posameznika. Predvsem pa so doslej manjkala natančna merila za semikvantitativno stopnjevanje. V času od nastanka Priporočil o mikroskopskem vrednotenju razmaza krvi smo tudi v mednarodnem prostoru dobili smernice, kako naj bi pravilno vrednotili eritrocitno krvno sliko in kako k temu pristopamo, da je čim bolj objektivizirano in ponovljivo. Ter da z izvidom pregleda ustrezno opozorimo na klinično pomembne najdbe. In na osnovi teh poročil je delovna skupina za laboratorijsko hematologijo (DSLH) pri SZKKLM pripravila in l.2022 na svoji spletni strani objavilo gradivo »Vrednotenje in poročanje sprememb v eritrocitni krvni sliki«, ki je prosto dostopno slovenskim laboratorijem in ostali zainteresirani javnosti. V teh priporočilih so poenoteni številčni kriteriji za opredeljevanje morfoloških sprememb. To olajša delo in v veliki meri preseže pomanjkljivosti subjektivnega opredeljevanja.

Ključno izhodišče uspešnega vrednotenja eritrocitne krvne slike je gotovo dobro pripravljen, sušen in obarvan krvni razmaz. Eritrocitna krvna slika je namreč najbolj občutljiva za morebitne predanalitske in tehnične napake pri pripravi razmaza. Z neustrezno pripravo vnašamo artefakte

(npr. ehinociti pri starih vzorcih). Za zanesljivo semikvantitativno oceno (posamezni/blaga, maloštevilni/zmerna, številni/izrazita) moramo vrednotiti vsaj 1000 eritrocitov. Ker v rutinskem delu tega ne počnemo, mora vsak laboratorij za razpoložljive mikroskope določiti število eritrocitov na vidno polje in nato na osnovi te vrednosti preračunati, kolikšen je dejanski delež odstopajočih eritrocitov.

Mednarodne smernice so precej zadržane glede poročanja sprememb v krvni sliki in poudarjajo, da se moramo osredotočati le na klinično pomembne spremembe, medtem ko se opisovanju nepomembnih izogibamo. To velja za večino sprememb v obliki in obarvanosti kot za vključke. Sprememb, ki so posamezne/blage večinoma ne poročamo. Ob tem je pomembno poudariti, da je številčna meja za spremembe, ki se poročajo, večinoma visoka (>10%). Seveda pa so nekatere najdbe, kjer se meja poročanja zmanjša, ker je njihov klinični pomen večji.

Pri stopnjevanem opisu za anizocitozo, mikro/makrocitozo in hipokromijo je zelo pomembno upoštevati eritrocitne indekse hematološkega analizatorja (MCV, MCH, RDW). Ti indeksi so zaradi velikega števila vrednotenih eritrocitov praviloma zanesljivejši. Obenem se moramo zavedati, da je npr. povečana vrednost RDW, kljub normalni vrednosti MCV, lahko posledica prisotnosti mikrocitov oziroma makrocitov, zato moramo vrednost realno ovrednotiti pod mikroskopom. Načeloma smernice priporočajo večjo specifičnost v izrazoslovju (npr. akantocitoza, hipokromija) kot pa uporabo širših pojmov, kakršni so npr. anizocitoza, poikilocitoza in anizokromija razen, če so izrazito prevladujoča najdba.

Pri spremembah v obliki gre izpostaviti shizocite, ki so ob parazitih edina kritična najdba v eritrocitni krvni sliki, zahtevajo posebno pozornost pri izobraževanju laboratorijskega osebja, da je njihovo poročanje pravilno. Meja za poročanje je 1%, ki je ob trombocitopeniji in anemiji tudi vrednost, ki močno podpira klinični sum na mikroangiopatsko dogajanje. Meja 1-2% velja tudi za drepanocite, ki so v našem okolju izjemno redka najdba ter za vključke v eritrocitih, ki jih srečujemo pogosteje.

Gradivo DSLH je pripravljeno v pregledni tabelarični obliki, da bi laboratorijem lahko služilo pri rednem vrednotenju krvnih razmazov. Opozoriti velja, da je prav eritrocitna krvna slika tista, ki zaradi raznolikosti v spremembah oblike in obarvanosti začetnikom povzroča težave. Zato je nujno, da odgovorni poskrbijo tudi za ustrezno slikovno gradivo, ki vrednotenje olajša.

## Viri

1. Vrednotenje in poročanje sprememb v krvni sliki. Dostopno na: <https://www.szklm.si/si/vsebina/projekti-zdruzenja/delovne-skupine> (20.3.2023)
2. Palmer L, Briggs C, McFadden S et al. ICHS recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int.J Lab.Hematol* 2015, 37: 287-303.
3. Buoro S, Rin G, Fanelli A, Lippi G. Harmonization of interpretative comments in laboratory hematology reporting: the recommendations of the Working Group on Diagnostic Hematology of the Italian Society of Clinical Chemistry and Clinical Molecular Biology (WGDH-SIBioC) *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(1): 66–77
4. Constatino BT. Reporting and grading of abnormal red blood cell morphology. *Int.J Lab.Hematol* 2015, 37: 1-7.

## Bolezni eritrocitne vrste s strani hematologa

*Saša Anžej Doma*

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

*sasa.anzej.doma@kclj.si*

Bolezni rdeče vrste so različne vrste anemij in eritrocitoze. Anemija je eno najpogostejših stanj v medicini, pri čemer je etiologija zelo široka in vključuje reaktivna in neoplastična stanja. Eritropoezo uravnavajo snovi, ki so pomembne za zaznavanje in regulacijo kisika, rastni faktorji, med njimi najpomembnejši eritropoetin, in drugi dejavniki, npr. regulatorji metabolizma železa. Motnje v istih dejavnikih lahko vodijo tudi v eritrocitozo. Klonska eritropoeza v kostnem mozgu lahko vodi v eritrocitozo, a po drugi strani tudi v anemijo, kadar gre za displazijo in motnjo v dozorevanju.

Osnovni preiskavi, ki nam pomagata opredeliti anemijo, sta določitev povprečnega volumna eritrocitov (PVE) in število retikulocitov. Število retikulocitov, manjše od  $100 \times 10^9/L$ , odraža pomanjkljivo nastajanje eritrocitov (hipoproliferativne anemije in anemije zaradi motnje v dozorevanju). Obratno pa se pri anemiji zaradi krvavitve ali hemolize poveča število retikulocitov. Glede na PVE delimo anemije v mikrocitne, makrocitne in normocitne. Etiologijo anemije pogosto lahko ugotovimo iz anamneze in biokemičnih preiskav. V tabeli 1 so predstavljeni najpogostejši razlogi anemij.

Tabela 1: Najpogostejši razlogi anemij glede na povprečen volumen eritrocitov (PVE)

mikrocitna anemija (PVE <80 fL)	pomanjkanje železa, talasemija, zastrupitev s svincem, prirojena sideroblastna anemija
normocitna anemija (PVE 80-100fL)	anemija kroničnega vnetja (tudi ob maligni bolezni) z zdravili povzročena anemija anemija ob ledvični bolezni hemoliza izguba krvi klonalne hematološke bolezni mieloftiza/mielofibroza kombinirano pomanjkanja (železa, folata, vitamina B12, bakra)
makrocitna anemija (PVE >100 fL)	pomanjkanje vitamina B12 ali folatov jetrna bolezen, alkoholizem hipotiroza visoka retikulocitoza aplastična anemija, mielodisplastični sindrom zdravila, ki se vpletajo v sintezo DNA

Najpogosteje je anemija posledica *pomanjkanja železa* (zaradi premajhnega vnosa in izgub železa), po pogostnosti ji sledi *anemija vnetja*. Ta spremlja najrazličnejša stanja: okužbe, kronična vnetja, rakave bolezni, akutna bolezenska stanja, kronično ledvično ali jetrno bolezen, srčno popuščanje, nekatere endokrine bolezni. Prva je pogosteje mikrocitna, druga normocitna, možno je prekrivanje. Kadar je anemija makrocitna, najprej pomislimo na *pomanjkanje vitamina B12 in folatov*, čeprav je to bistveno redkejše kot pomanjkanje železa. Za hematologa zanimivejše so *anemije zaradi hemolize*. Eritrociti lahko razpadajo v krvnem obtoku (intravaskularna hemoliza) ali v retikuloendotelijskem sistemu, predvsem v vranici (ekstravaskularna hemoliza). Laboratorijski znaki hemolize so povišan nekonjugiran bilirubin in laktatna dehidrogenaza. Intravaskularna hemoliza povzroči vezavo in zmanjšanje haptoglobina v plazmi, pri hujši hemolizi pa pojav prostega hemoglobina v plazmi (hemoglobinemija) in tudi v urinu (hemoglobinurija), lahko pa pride do vezave hema na albumin (methemalbuminemija). Hemosiderin v urinu je znak kronične ali ponavljajoče se intravaskularne hemolize. Hemolitična anemija je običajno



normocitna, če je število retikulocitov veliko, pa je makrocitna. Pri hudi anemiji se v krvi pojavijo tudi eritroblasti.

Ko ugotovimo, da je anemija hemolitična, jo poskušamo nadalje opredeliti. Včasih že značilne morfološke spremembe eritrocitov v krvnem razmazu sugerirajo vzrok (shizociti- mehanična okvara eritrocitov; sferociti- dedna sferocitoza ali avtoimunska hemolitična anemija; drepanociti- hemoglobin S; kodociti- HbC, HbD, talasemija; Heinzova telesca- pomanjkljiva aktivnost glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, nestabilni hemoglobini; akantociti-jetrna bolezen).

S Coombsovimi testi ugotavljamo, ali je anemija avtoimunska, tj. povzročena s protitelesi proti antigenom lastnih eritrocitov (pozitiven direktni Coombsov test, redkeje indirektni). Glede na temperaturo, pri kateri se protitelesa vežejo na antigene eritrocitov, razlikujemo pogostejšo *avtoimunsko hemolitično anemijo s toplimi protitelesi* in redkejšo *avtoimunsko hemolitično anemijo s hladnimi protitelesi*. Ločimo ju na osnovi kliničnih podatkov in seroloških značilnosti avtoprotiteles. Avtoimunska hemolitična anemija je lahko pridružena limfoproliferativnemu obolenju, revmatski bolezni, okužbi.

Pri negativnih Coombsovih testih moramo pomisliti na druge razloge hemolize: *dedna sferocitoza* je pri nas najpogostejša vrsta dedne hemolitične anemije. Zaradi nenormalnosti v beljakovinskem ogrodju eritrocitne membrane sferociti v vranici bolj razpadajo. PVE pri bolnikih s sferocitozo je normalen ali nekoliko zmanjšan. Za postavitev diagnoze uporabljamo preiskavo z barvilom eozin-5-maleimidom (EMA), ki temelji na pretočni citometriji, možna je tudi genetska potrditev diagnoze. Za *paroksizmalno nočno hemoglobinurijo (PNH)*, ki nastane zaradi napake v eritrocitni membrani, da postane bolj dovzetna za litični kompleks komplementa, je značilna kombinacija intravaskularne hemolize, citopenij (ker gre za klonsko bolezen krvotvornih matičnih celic) in nagnjenosti k trombozam. Hemoglobinurijo po spanju večina bolnikov nima, vedno pa je prisotna hemosiderinurija. Odločilna preiskava za dokaz PNH je pretočna citometrija. Za *mikroangiopatično hemolitično anemijo* so značilni shizociti, pogosto ji je pridružena trombocitopenija. V tem kontekstu moramo ob ustrezni klinični sliki (huda mikroangiopatična hemolitična anemija in trombocitopenija, nevrološki izpadi, prizadetost prebavil, šibkost) pomisliti na trombotično trombocitopenično purpuro, ki je urgentno stanje. Drugi razlogi za mikroangiopatično anemijo (in trombocitopenijo) so maligna arterijska hipertenzija, nosečnostni zapleti, okužbe, karcinomi z zasevki, zavrnitvena reakcija ledvice ali krvotvornih matičnih celic, hemolitično uremični sindrom, diseminirana intravaskularna koagulacija. Hemolitične anemije lahko nastanejo tudi zaradi neposredne poškodbe eritrocitov pri opeklinah, valvularnih hibah, zastrupitvah z arzenom, svincem itd, po pikih nekaterih kač in žuželk, pri nekaterih okužbah (malarija, bartoneloza) in po transfuziji. Tudi določena zdravila sprožijo hemolizo, posebna dedna motnja pa je *zmanjšana aktivnost glukoza-6-fosfat dehidrogenaze*, ki povzroči hemolizo po

zaužitju zdravil (in tudi nekaterih živil) z oksidacijskim učinkom. Motnje v sintezi globina, *talasemije in hemoglobinopatije*, so dedne bolezni, ki jih karakterizira neučinkovita eritropoeza in ekstravaskularna hemoliza. Nekatere hemoglobinopatije povzročajo cianozo. Diagnozo postavimo z elektroforezo hemoglobina in molekularno- genetskimi preiskavami. Pri anemiji, ki je ne uspemo pojasniti z do sedaj naštetimi razlogi, napravimo preiskave kostnega mozga. Te lahko odkrijejo/potrdijo različna hematološka obolenja, na katere sicer lahko posumimo že na osnovi diferencialne krvne slike ali laboratorijskih najdb (prisotnost monoklonskega proteina-diseminirani plazmocitom, limfom). Pretočna citometrija nam pomaga pri opredeljevanju klonskih bolezni, diagnostični in prognostični pomen imajo tudi genetske in citogenetske preiskave. V kostnem mozgu pa lahko najdemo še *zasevke nehematoloških rakov, povzročitelje okužbe* (tuberkuloza), *bolezni skladiščenja. Sideroplastne anemije*, ki se kažejo z značilnim kopičenjem prstanastih sideroplastov v kostnem mozgu, so lahko tudi dedne. Anemija pri *mielodisplastičnem sindromu* je makro- ali normocitna, lahko so ji pridružene še druge citopenije, značilna je displazija in hiperplazija, pogoste so citogenetske nepravilnosti. Klonska ekspanzija eritroidnih prekurzorjev v kostnem mozgu lahko vodi tudi v *eritrolevkemijo*, tj. popolno motnjo dozorevanja na stopnji zgodnje eritropoeze. *Pridobljena čista aplazija rdeče vrste* je redek razlog anemije, ki jo karakterizira nizko število retikulocitov ( $<10 \times 10^9/L$  oz.  $<0,5\%$ ) in praktična odsotnost eritroidnih prekurzorjev v kostnem mozgu. Lahko gre za primarno (idiopatsko avtoimuno) obliko ali pa sekundarno (pridruženo limfoproliferativnim obolenjem, kronični mieloični levkemiji ali primarni mielofibrozi, revmatskim obolenjem, ali pa je posledica ABO neskladja pri presaditvi krvotvornih matičnih celic, nekaterih zdravil in okužb -Parvovirus B19, EBV, tudi nekaterih drugih rakov in celo nosečnosti). Izmed eritrocitov je za hematologa najbolj zanimiva *policitemija vera*, ki je najpogostejša pridobljena primarna eritrocitoza, t.j. eritrocitoza zaradi napake v kostnem mozgu. Enostavno jo potrdimo z določitvijo *JAK2* mutacije (pozitivna pri več kot 95% bolnikov) in koncentracijo eritropoetina, ki je tipično znižana. Pogostejše so sicer sekundarne eritrocitoze, ki jih sprožijo stanja hipoksemije (bolezni srca in pljuč, hipoventilacija, kronična izpostavljenost ogljikovemu monoksidu, življenje na visoki nadmorski višini) ali pa neustrezno izločanje eritropoetina (paraneoplastično, ledvične bolezni, eksogen vnos). Prirojene eritrocitoze so redke in jih lahko dokažemo z genetskim testiranjem.

## Viri

1. Valent P, Büsche G, Theurl I, Uras IZ, Germing U, Stauder R, et al. Normal and pathological erythropoiesis in adults: from gene regulation to targeted treatment concepts. *Haematologica*. 2018;103(10):1593-1603.
2. Zver S, Škerget M. Bolezni celic rdeče vrste. In: Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Jug B, Kocjan T, Koželj M, eds. *Interna medicina*. 6. Izdaja. Ljubljana: Littera picta, Slovensko medicinsko društvo; 2022. p.1121-1150

3. Means RT, Brodsky RA. Diagnostic approach to anemia in adults. UpToDate 9/2022
4. Schop A, Stouten K, Riedl JA, van Houten RJ, Leening MJG, van Rosmalen J, et al. A new diagnostic work-up for defining anemia etiologies: a cohort study in patients  $\geq 50$  years in general practices. *BMC Fam Pract.* 2020 Aug 16;21(1):167
5. Drnovšek E, Anžej Doma S, Kristan A, Debeljak N, Preložnik Zupan I. Obravnava bolnikov z neklonsko eritrocitozo. *Zdrav Vestn.* 2023; 92 (Epub ahead of print):1–9.

## Analiza eritrocitne vrste s pretočno citometrijo

*Katarina Reberšek*

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

*katarina.rebersek@kclj.si*

V Specializiranem hematološkem laboratoriju, UKC Ljubljana s pretočno citometrijo analiziramo eritrocite bolnikov, pri katerih obstaja sum na (dedne) hemolitične anemije, ki nastanejo zaradi napake v eritrocitni membrani.

Podedovana sferocitoza (PS), eliptocitoza (PE) in stomatocitoza so dedne hemolitične anemije, ki nastanejo zaradi napake v eritrocitni membrani. PS nastane zaradi pomanjkanja spektrina, ankirina, beljakovine 3 ali proteina 4.2. PE nastane zaradi pomanjkanja proteina 4.1R ali kvalitativne okvare spektrina, t.i. variant spektrina. Podedovana piropoikilocitoza (HPP) predstavlja eno izmed hudih oblik PE, pri kateri pride do *in vivo* fragmentacije eritrocitov. Nastanejo mikrosferociti, ki imajo zmanjšano vsebnost spektrina.

Diagnoza se postavi na osnovi klinične slike, družinske anamneze, krvne slike, števila retikulocitov, morfologije eritrocitov, biokemije ter presejalnih testov. Za končno potrditev diagnoze so potrebne dodatne preiskave, kot so natrij dodecil sulfat (SDS) poliakrilamidna gelska elektroforeza proteinov eritrocitne membrane, meritve monovalentnih kationov ter molekularno genetske analize. Slednje pridejo v poštev na koncu diagnostičnega algoritma, predvsem pri boleznih, ki se dedujejo recesivno, če obstaja sum na novo nastalo mutacijo ter pri sestavljenih heterozigotih.

Med presejalne teste spada tudi EMA test, ki ga izvajamo v Specializiranem hematološkem laboratoriju, UKC Ljubljana s pretočno citometrijo. Eozin-5 -maleimid (EMA) je derivat eozina. Maleimidi reagirajo s prostimi sulfhidrilnimi skupinami cisteina v proteinih. Nepričakovano pa EMA reagira z amino skupino lizina beljakovine 3, ki predstavlja 25% proteinov v membrani eritrocita ter s prostimi sulfhidrilnimi skupinami 4-ih transmembranskih proteinov (Kell, CD47, Rh glikoprotein in Rh protein), ki pa so prisotni v manjših deležih. EMA se lahko veže na vse eritrocite, ne glede na velikost in obliko. Z EMA testom lahko zaznamo PS, pri kateri je količina proteinov na membrani eritrocitov zmanjšana, kar se kaže kot zmanjšana povprečna fluorescenca sferocitov (PFE) v primerjavi z normalnimi eritrociti. Podobne, pozitivne rezultate lahko dobimo tudi pri SAO (South East Asian ovalocytosis), kriohidrocitozi in kongenitalni diseritropoetični anemiji tipa II. Razlikovanje med entitetami temelji na morfologiji eritrocitov in SDS poliakrilamidni gelski

elektroforezi proteinov eritrocitne membrane. Z EMA testom lahko zaznamo tudi HPP, kjer eritrociti kažejo še nižjo PFE kot eritrociti pri PS.

Vsi vzorci morajo biti testirani znotraj 3-eh dni po odvzemu, ker lahko pri bolniku z izrazito hemolizo pride do *ex vivo* lize najbolj dovzetnih eritrocitov. Če je pri bolniku s PS ali HPP prisotna mešana populacija eritrocitov, prav tako ne dobimo prave slike o sestavi eritrocitov, če je testiranje časovno zamaknjeno. Lažno negativen rezultat dobimo tudi, ko analiziramo vzorec bolnika, ki je pred kratkim prejel transfuzijo eritrocitov, saj je potrebno približno 8 tednov, da se celice iz transfuzije izločijo iz obtoka.

EMA test se lahko uporabi kot samostojni presejalni test, ko so na voljo ustrezni klinični in laboratorijski izvidi. Izvid EMA testa je lahko lažno negativen, zato je priporočljivo, da se pri značilnih kliničnih znakih, t.j. blaga kronična hemolitična anemija, povišan bilirubin, žolčni kamni, retikulocitoza in splenomegalija, uporabi dva presejalna testa. Slabost testa je pomanjkanje enotnih referenčnih vrednosti, ker so odvisne od nastavitve pretočnega citometra v laboratoriju.

Pri vsaki preiskavi EMA testa vzporedno z bolnikovim vzorcem vrednotimo 3 normalne kontrolne vzorce, pri čemer en kontrolni vzorec delamo v duplikatu.

Določimo odstotek zmanjšanja PFE bolnika glede na vrednost PFE kontrolnega vzorca. Če je zmanjšanje PFE manjše od 15%, izvid interpretiramo kot negativen za PS, če je večje od 20%, izvid interpretiramo kot pozitiven za PS. Zmanjšanje med 15-20% predstavlja območje sive cone, ki zahteva analizo sorodstva.

Paroksizmalna nočna hemoglobinurija (PNH) je edina pridobljena hemolitična anemija zaradi napake v eritrocitni membrani. Bolezen je klonska; eritrociti, trombociti in levkociti, ki imajo za PNH značilno napako v membrani, izvirajo iz iste, z mutacijo spremenjene matične celice. Napaka v celični membrani, ki je posledica pomanjkanja nekaterih membranskih proteinov, povzroči povečano dovzetnost za litični učinek komplementa in zato razpad eritrocitov. V krvi sta hkrati dve populaciji eritrocitov: normalna in tista z napako v membrani. Stopnja hemolize je odvisna od razmerja med njima. Majhni kloni PNH se pojavljajo tudi pri aplastični anemiji (AA) in mielodiplastičnemu sindromu (MDS).

Imunološke celične označevalce, značilne za PNH, določamo na membrani eritrocitov in levkocitov (nevtrofilni granulociti in monociti) periferne krvi. Za oceno velikosti PNH klona eritrocitov uporabimo CD59 v kombinaciji s CD235a. Glede na intenziteto fluorescence odčitamo delež CD235a pozitivnih eritrocitov, ki so povsem negativni na CD59 (tip III), delež šibko pozitivnih na CD59 (tip II) in delež z normalno izraženo fluorescenco CD59 (tip I). Vsota deležev eritrocitov tipa II in tipa III predstavlja PNH klon na eritrocitih.

Priporočljiva meja kvantifikacije za nevtrofilne granulocite je 0,1% za monocite 0,5% ter za eritrocite 0,01%. Če zaznamo več kot 50 celic PNH, v izvid izdamo kvantitativen rezultat. Če zaznamo več kot 20 celic PNH, vendar manj kot 50 celic PNH, izdamo izvid kot pozitiven, vendar pod mejo kvantifikacije.

PNH klon določamo izključno na zrelih celicah. V primeru pomika v levo vzorec ni primeren za analizo zaradi lažno pozitivnih rezultatov. Prav tako preiskave ne izvajamo po prejemu transfuzije zaradi lažno negativnih rezultatov.

V izvidu navedemo, če je klon PNH prisoten. V kolikor je klon PNH prisoten, za poročanje uporabimo terminologijo, ki je skladna s smernicami CSLI (*The Clinical and Laboratory Standards Institute*), ter ob tem navedemo velikost klona PNH med eritrociti (velikost celotnega klona PNH, velikost klona tipa II in tipa III), velikost klona PNH na levkocitih, in sicer na nevtrofilnih granulocitih in monocitih. V izvid navedemo tudi označevalce za zamejitev in diagnostične označevalce, ki jih uporabimo v testiranju za PNH, ter mejo kvantifikacije za eritrocite in za nevtrofilne granulocite, če obstaja sum na AA ali MDS. Navedemo tudi priporočila za ponovno testiranje in pogostost le-tega.

## Viri

1. King MJ, Garçon L, Hoyer JD, Iolascon A, Picard V, Stewart G, et al. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *Int Jnl Lab Hem.* 2015;37:304-25.
2. Dezern AE, Borowitz MJ. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 1 – Clinical Utility. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry).* 2018;94B:16-22.
3. Sutherland DR, Illingworth A, Marinov I, Ortiz F, Andreasen J, Paynel D et al. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 2 – Reagent Selection and Assay Optimization for High-Sensitivity Testing. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry).* 2018;94B:23-48.
4. Illingworth A, Marinov I, Sutherland DR, Wagner-Ballon O, DeVecchio L. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 3 – Data Analysis, Reporting and Case Studies. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry).* 2018;94B:49-66.
5. Oldaker T, Whitby L, Saber M, Holden J, Wallace PK, Litwin V. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 4 – Assay Validation and Quality Assurance. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry).* 2018;94B:67-81.

## Motnje delovanja eritrocitnih encimov

*Alenka Trampus Bakija*

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

*alenka.trampus@kclj.si*

Eritrociti v periferni krvi živijo povprečno med 100 in 120 dni. Celice nimajo jedra, njihova citoplazma nima organelov, RNA in ribosomov, ki bi sodelovali pri sintezi proteinov. Zato so odvisni od procesa razgradnje glukoze. Koncentracija glukoze v eritrocitih je približno 5 mM. Presnavlja se po 2 metabolnih poteh: z glikolizo (kjer nastaja ATP) in heksoza monofosfatno potjo (kjer nastaja NADPH). Pri slednji poti se porabi 5-10 % celične glukoze. NADH se vključuje v redukcijo glutationa, ki celice ščiti pred oksidativnim stresom.

Skupna lastnost encimopatij eritrocitov so hemolize. Kljub različni klinični sliki so laboratorijske najdbe, simptomi in zapleti pri bolnikih podobni. Ker je življenska doba eritrocitov skrajšana, so bolniki slabokrvni, epizode hemoliz pa so blage ali težke. Pri težkih so pogosto potrebne transfuzije. Za bolnike je značilna kompenzatorna eritropoeza, ob hemolizah pa kot posledica visokega nekonjugiranega bilirubina rumene beločnice ali zlatenica. Značilne laboratorijske najdbe so: nizek hemoglobin, normalen ali visok MCV, visoki retikulociti, visok indirektni bilirubin, višja aktivnost LDH. Za izključitev encimopatije so ugotovljeni negativni rezultati direktnega Coombsovega testa, membranskih nepravilnosti (EMA test), elektroforeze hemoglobinov, v krvnem razmazu pa ne najdemo odstopanj v morfologiji eritrocitov.

Najpogostejša motnja delovanja eritrocitnih encimov, za katero je prizadetih več kot 400 milijonov ljudi na svetu, je pomanjkanje glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD). Gen za encim leži na X kromosomu, zato se bolezen običajno izrazi pri moških. Heterozigotne ženske imajo povprečno 50% aktivnost encima in največkrat nimajo klinične slike s hemolizo. Klasifikacija bolezni, kot jo predlaga svetovna zdravstvena organizacija, opredeljuje razrede od I-IV glede na encimsko aktivnost in izražene stopnje hemolize. Opredelitev genetskih variant je pomembna predvsem za napoved kliničnega poteka bolezni. Genetske variante so velikokrat demografsko značilne. Največ variant povzroči sprememba enega nukleotida. Posledice so bodisi kvali- ali kvantitativne spremembe encima. Encim je zaradi spremembe nestabilen in njegov razpolovni čas je bistveno krajši od normalnega (iz 60 dni se skrajša na 14 dni ali celo manj). Zaradi neaktivnosti encima pride do padca znotrajceličnega NADH, zmanjšane zaščite pred oksidativnim stresom in tako postanejo eritrociti neodporni na poškodbe. Čas v katerem se odstranijo iz obtoka v retikuloendotelnem

sistemu je zato kratek. Diagnostika temelji na opredelitvi encimske aktivnosti G6PD ter se dopolnjuje z genetskimi testi. Določitev aktivnosti encima je lahko kvalitativna (redkeje uporabljena in ne omogoča klasifikacije bolezni) ali kvantitativna. Slednja temelji na spektrofotometričnem principu pretvorbe NADP v NADPH. Vzorec izbora je polna kri z dodatkom antikoagulanta. Referenčni interval je med 1,97 – 2,40  $\mu\text{kat}/10^{12}$  eritrocitov. Bolniki imajo lahko aktivnost encima tudi normalno, če so v trenutku odvzema najhujše prizadeti eritrociti že odstranjeni iz obtoka ali če je bolnik dobil transfuzijo eritrocitov. V takem primeru je potrebno encimsko analizo ponoviti čez 3 mesece. Fluorescenčni test se uporablja pogosteje pri presejalnih programih odkrivanja pomanjkanj. V Sloveniji presejanje za to bolezen ne poteka. Diferencialno diagnostično pri novorojenčkih pomislimo na motnjo pri izraziti nepojasneni hiperbilirubinemiji, pri starejših pa ob neimunogeni hemolitični anemiji, še posebno po okužbah, ob jemanju nekaterih zdravil ali zaužitju boba. Poleg encimske aktivnosti pacientom v sklopu laboratorijskih preiskav določimo krvno sliko z retikulociti, v mikroskopskem pregledu krvnega razmaza najdemo t. i. »blister« celice (keratociti), v nekaterih primerih tudi sferocite, v serumu določimo indirektni bilirubin in LDH. Pri novorojenčkih je določanje encimske aktivnosti oteženo, saj se raven encima v prvih tednih spreminja zaradi drugačne eritropoeze po rojstvu. V naslednji stopnji z metodo elektroforeze izključujemo hemoglobinopatije in motnje eritrocitne membrane (EMA test). Genetsko testiranje je v Sloveniji omogočeno na Pediatrični kliniki in zajema direktno sekvenciranje gena *G6PD* po Sangerju, ter v primeru negativnega najdbe uporabo qPCR MLPA metode in sekvenciranja naslednje generacije. Najpogostejša, a še vedno redka motnja glikolitičnega cikla je pomanjkanje encima piruvat kinaze (PK). Večina teh motenj je odkritih v otroški dobi, približno četrtnina bolnikov pa ima težave že in utero. V neonatalni obdobju je prisotna huda zlatenica, lahko je potrebna izmenjalna transfuzija. Pojavljajo se kronična anemija, retikulocitoza in indirektna hiperbilirubinemija ob splenomegaliji. Pri otrocih hemolitične krize večkrat sprožijo okužbe (npr. s parvovirusi). V genu za PK v eritrocitih (*PKLR*) je opisanih že več kot 300 različnih mutacij. Bolniki so homozigoti s patogeno varianto ali sestavljeni heterozigoti dveh variant. Klinična slika je odvisna od narave spremembe encima in je lahko blaga do težka. Pri vseh se zniža količina nastalega ATP, kar povzroči hitrejši razpad celic v vranici. Količina ATP se manjša s starostjo retikulocita oz. eritrocita. V laboratorijskem preiskovanju najdemo v krvnem razmazu anizocitozo, poikilocitozo, polikromazijo eritrocitov, posamezni eritrociti imajo lahko izrastke. S supravitalnim barvanjem lahko zaznamo Heinzova telesca, ki so nahajajo ob membrani eritrocita. Aktivnost PK merimo s kvantitativno encimsko spektrometrično metodo. Bolniki imajo aktivnosti encima, ki znašajo 5 – 25 % normalne aktivnosti. Kadar so aktivnosti mejne, je smotrno hkrati določati aktivnosti tudi drugih eritrocitnih encimov. Stopnja hemolize in nivo aktivnosti PK nista povezana. Genetske tehnike dopolnjujejo biokemične metode. Prepoznavna bolnikov zna biti kompleksna, sploh če potrebujejo ob hemolizah pogoste transfuzije.



Pomanjkljivosti ostalih eritrocitnih glikolitičnih encimov so še redkejše. Pomanjkanje glukoza-6-fosfat izomeraze (ni nastanka 2,3-difosfoglicerata, ki je pomemben za uravnavanje afinitete kisika do hemoglobina) predstavlja do 5% vseh encimopatij, pomanjkanje pirimidin 5' nukleotidaze (prizadene metabolizem razgradnje purinskih nukleotidov) do 3 % in pomanjkanje heksokinaze (prizadeta pot glikolize in metabolizma glutationa) ter drugih encimskih motenj pa <1% encimopatij. Klinični znaki so zelo podobni tistim pri pomanjkanju PK. Motnje eritrocitnih encimov so redke motnje, ki jih opredeljujemo pri bolnikih s kronično hemolitično anemijo. Ob osnovnem začetnem laboratorijskem preiskovanju, nadaljevalni pristop pri vseh motnjah vključuje izvedbo specifične encimske metode in molekularno genetsko testiranje. Postavitev diagnoze je pomembna za primerno podporno obravnavo bolnikov, spremljanje akutnih in kroničnih zapletov ter zdravljenja.

### Viri

1. Grace RF, Glader B. Red Blood Cell Enzyme Disorders. *Pediatr Clin North Am.* 2018;65(3):579-95.
2. Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2016;30(2):373-93.
3. Arunachalam AK, Sumithra S, Maddali M, Fouzia NA, Abraham A, George B, Edison ES. Molecular Characterization of G6PD Deficiency: Report of Three Novel G6PD Variants. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2020;36(2):349-55.
4. Bianchi P, Fermo E, Glader B, Kanno H, Agarwal A, Barcellini W, et.al.; with the endorsement of EuroBloodNet, the European Reference Network in Rare Hematological Diseases. Addressing the diagnostic gaps in pyruvate kinase deficiency: Consensus recommendations on the diagnosis of pyruvate kinase deficiency. *Am J Hematol.* 2019;94(1):149-161.
5. Kim Y, Park J, Kim M. Diagnostic approaches for inherited hemolytic anemia in the genetic era. *Blood Res.* 2017;52(2):84-94.
6. Tavazzi D, Taher A, Cappellini MD. Red blood cell enzyme disorders: an overview. *Pediatr Ann.* 2008;37(5):303-10.

## MASTOCITOZA (HLZ)

### Mastocitoza- pogled hematologa

*Matevž Škerget*

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

*matevz.skerget@kclj.si*

Mastociti so prisotni v vezivnem tkivu številnih organov, kjer sodelujejo pri imunski toleranci, angiogenezi in zaščiti pred mikroorganizmi z izločanjem aktivnih snovi shranjenih v znotrajceličnih granulah. Med pomembnejše molekule, ki jih izločajo, sodijo serotonin, histamin in heparin. Mastocitoza je nekontrolirana klonska razrast mastocitov v tkivih, ki lahko povzroči simptome zaradi infiltracije organov in izločanja aktivnih snovi. Pri napredovali obliki mastocitoze lahko obsežna infiltracija vodi do osteoporoze, osteolize in zlomov kosti. Prizadetost kostnega mozga lahko povzroči pancitopenijo, infiltracija organov pa hepatosplenomegalijo in jetrno okvaro. Indolentna sistemsko mastocitoza se kaže predvsem z izločanjem aktivnih snovi, kar povzroča kožne simptome, driske, epizode zardevanja in srbečice ter večje tveganje za hudo in hitro potekajočo anafilaktično reakcijo. Sindrom aktivacije mastocitov je podoben in se lahko pojavi tudi pri bolnikih brez histološko dokazane mastocitoze. Pri bolnikih s klonskim sindromom aktivacije mastocitov pa najdemo prisotnost mutacije na *c-KIT*, vendar bolnik nima histoloških znakov za sistemsko mastocitozo.

Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) deli mastocitozo na kožno in sistemsko, to pa glede na prizadetost organov. Pri kožni mastocitozi je koža edini prizadeti organ, oblika pa je pogosta pri otrocih in do pubertete mine sama brez zdravljenja. Najpogosteje se kaže kot makulopapularen, temneje pigmentiran izpuščaj - urtikarija pigmentoza. Redkejšje so oblike z difuzno prizadetostjo kože ali z večjo tumorsko spremembo - mastocitom. Pri odraslih s prizadeto kožo pa večinoma najdemo tudi prizadetost ostalih organov, zato govorimo o sistemski mastocitozi. To lahko ločimo glede na klinično sliko in laboratorijske pokazatelje. Pri indolentni sistemski mastocitozi niso prisotni znaki agresivnejšega poteka. Pri tleči sistemski mastocitozi so prisotni B pokazatelji, kot so močno povečana serumska triptaza (> 200 ng/mL), povečani organi in večja infiltracija kostnega mozga z mastociti (> 30 %). O agresivni sistemski mastocitozi govorimo, ko zaradi infiltracije z mastociti pride do okvare delovanja organov, predvsem motnje v delovanju jeter, malabsorpcije in pancitopenije (C pokazatelji). V letu 2022 so v klasifikacijo dodali tudi sistemsko mastocitozo

kostnega mozga, pri kateri ne najdemo prizadetosti kože in drugih organov. Zanj je značilno predvsem večje tveganje za pojav osteoporoze, ki je posledica izločanja aktivnih snovi in velikega tveganja za anafilaksijo. Mastocitna levkemija in sarkom sta redki bolezni. Tabela 1 prikazuje delitev mastocitoze, tabela 2 pa diagnostična merila po SZO

Tabela 1: Delitev mastocitoze po Svetovni zdravstveni organizaciji 2022

1. Kožna mastocitoza
2. Sistemska mastocitoza
Indolentna sistemska mastocitoza
Sistemska mastocitoza kostnega mozga
Tleča sistemska mastocitoza
Sistemska mastocitoza s pridruženo krvno novotvorbo
Agresivna sistemska mastocitoza
Mastocitna levkemija
3. Mastocitni sarkom

Tabela 2: Diagnostična merila za sistemska mastocitozo po Svetovni zdravstveni organizaciji 2022. (SM: sistemska mastocitoza)

Glavno merilo za SM	Multifokalni agregati mastocitov v kostnem mozgu ali drugem organu (>15 mastocitov na agregat)
Pomožna merila za SM	<ul style="list-style-type: none"> <li>i. Mastociti s patološko vretenasto obliko (&gt; 25%)</li> <li>ii. Prisotnost mutacije na <i>KIT</i> na mestu 816</li> <li>iii. Mastociti s patološkim izražanjem CD2 in/ali CD25 in/ali CD30</li> <li>iv. Serumska triptaza &gt; 20 ng/ml (ne ob pridruženi hematološki klonalni bolezni)</li> </ul>
Potrebno je eno glavno in eno pomožno merilo ali tri pomožna merila	

Pri sledenju bolnikov v klinični praksi nam pomaga določanje serumske triptaze in alelnega bremena za *c-KIT* mutacijo iz venske krvi. Triptaza odraža predvsem maso bremena z mastociti in je višja pri bolnikih z napredovalo obliko mastocitoze. Nasprotno pa je alelno breme *c-KIT* pogosto višje pri bolnikih s sistemska mastocitozo in pridruženo krvno novotvorbo, saj je mutacija prisotna

tudi v drugih mieloičnih celičnih vrstah. Molekularne preiskave so pri sistemski mastocitozi odkrile tudi druge točkovne mutacije, ki so prisotne pri mieloičnih novotvorbah. Te mutacije so nam v pomoč pri opredelitvi prognoze. Mutacije v genih *ASXL1/RUNX1/NRAS* predstavljajo neodvisen negativni prognostični pokazatelj.

Zdravljenje bolnikov je odvisno od tipa bolezni in bolnikovih težav. Indolentna sistemska mastocitoza in mastocitoza kostnega mozga posebnega zdravljenja ne potrebujeta. Bolnikove simptome zdravimo z antihistaminiki. Vsi bolniki potrebujejo tudi set za samopomoč z avto injektorjem adrenalina, kar je podrobneje opisano v prispevku alergologa. Bolnike z napredovalo sistemsko mastocitozo trenutno zdravimo s tirozinskima zaviralcema midostavrinom in avapritinibom. Redkeje lahko uporabimo standardne citostatike in kortikosteroide. Pri bolnikih s sistemsko mastocitozo in pridruženo krvno novotvorbo presodimo o izbiri zdravljenja posamezno. Načeloma velja, da je potrebno zdraviti tisto bolezen, ki bolnika bolj ogroža. V preteklosti smo se večinoma odločali za zdravljenje krvne bolezni, vendar nova spoznanja kažejo, da je *c-KIT* mutacija prisotna tudi v ostalih mieloičnih vrstah, zato je mogoče tudi zdravljenje s midostavrinom.

#### Viri

1. El Hussein S, Chifotides HT, Khoury JD , Verstovsek S, Thakral B. Systemic Mastocytosis and Other Entities Involving Mast Cells: A Practical Review and Update. *Cancers (Basel)*. 2022;17;14(14):3474.
2. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2021 Update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*. 2021;96(4):508-25.
3. Košnik M. Mastocitoza v alergologiji. Zbornik sestanka. Alergološka in imunološka sekcij SZD 2021. Dostopno na: <https://www.szd.si/wp-content/uploads/2021/03/szd-zbornik-sestanka-mastocitoza-v-alergologiji-marec-2021.pdf>
4. Cem Akin; How to evaluate the patient with a suspected mast cell disorder and how/when to manage symptoms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2022; 2022 (1): 55–63

## Mastocitoza - pogled s strani alergologa

*Peter Kopač*

*Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergologijo Golnik, Klinika Golnik*

*peter.kopac@klinika-golnik.si*

### Uvod

Bolezni povezane z prekomernim delovanjem mastocitov so zelo heterogena skupina in imajo tudi različne klinične fenotipe. Nekatere so zelo redke in bolj ohlapno klinično opredeljene – npr. sindrom aktivacije mastocitov, drugi pa pogostejše kot npr. sistemska mastocitoza. V tem prispevku se bomo omejili na povezavo z motnjo v aktivaciji mastocitov in anafilaksijo po piku kožekrilcev - ker je ta povezava najbolj raziskana in trenutno tudi klinično najpomembnejša.

### Anafilaksija

Anafilaksija je akutna težka sistemska preobčutljivostna alergijska reakcija, ki je lahko usodna. Razvije se v minutah in klinični simptomi in znaki so prizadetosti (edem sluznice grla, bronhospazem) in kardiovaskularnega sistema (hipotenzija, sinkopa). Pri večini bolnikov so prisotne tudi spremembe na koži in sluznicah (srbež, urtikarija in angioedem) ter tahikardija. Do smrtnih primerov pogosto pride ob prvi sistemski reakciji. Incidenca anafilaksije je med 50 in 112 epizodami na 100 000 oseb na leto, medtem ko je ocenjena vseživljenjska prevalenca od 0,3 do 5,1%. V Sloveniji je zabeleženih 0,55 smrti zaradi anafilaksije na leto. Dejavniki tveganja za anafilaksijo z smrtnim izidom vključujejo višjo starost, moški spol, belo raso, bolezni srca in ožilja, mastocitozo, neuporabo ali prepozno uporabo adrenalina, oddaljenost od nujne medicinske pomoči in pokončen položaj med anafilaksijo. Najpogostejši povzročitelji sistemskih alergijskih reakcij so hrana, strupi žuželk in zdravila. V Evropi je najpogostejši povzročitelj alergija na strup kožekrilcev (čebele, ose in sršeni). Vsaj 56,6 - 94,5 % ljudi doživi vsaj en pik kožekrilca v življenju. Večjo verjetnost za pik imajo čebelarji ter njihovi družinski člani, vrtnarji, gozdarji, sadjarji, motoristi in ljudje, ki veliko časa preživijo v naravi. Večina ljudi po piku kožekrilca nima zapletov, četrtnina ljudi lahko razvije veliko lokalno reakcijo, pri 5 - 7,5 % pa se lahko razvije sistemska alergijska reakcija. Teža sistemskih reakcij ima razpon od generaliziranih kožnih sprememb, do težke anafilaksije s smrtnim izidom. Večina smrti se zgodi pri odraslih moških. V zbirki nacionalnih podatkov o vzrokih smrti v Sloveniji so v desetih letih (2010 - 2019) zabeležili 27 smrti zaradi anafilaksije. Med smrtnimi primeri je bilo 47 % smrti zaradi anafilaksije po piku kožekrilca. Pri vseh preiskovancih, razen enega, je bila smrtna anafilaksija njihova prva alergijska reakcija v življenju.

## Bolezen mastocitev in anafilaksija

Najpomembnejši dejavnik tveganja za težji potek anafilaksije je bolezen mastocitov. Motnje v aktivaciji mastocitov (angl. MCAD, *mast cell activation disorders*) so heterogena skupina bolezni, pri katerih mastociti neustrezno in prekomerno sproščajo kemične mediatorje. Simptomi, ki nastanejo zaradi prekomernega izločanja mediatorjev, so srbež, rdečica, urtikarija, palpitacije, slabost in predvsem pogostejše anafilaksije. Te se lahko pojavijo tudi spontano, brez zunanjih dejavnikov, ob psihičnem ali fizičnem stresu. Veliko pogostejše kot v splošni populaciji pa so tudi težje anafilaktične reakcije ob piku žuželke. Za te paciente je značilen klinično drugačen potek anafilaktične reakcije: reakcija se pojavi zelo hitro, v času do 5 minut po piku; je težka s takojšnjimi znaki prizadetosti kardiovaskularnega sistema, kot so vrtoglavica, hipotenzija, kolaps in izguba zavesti, ob tem pa pacienti pogosto nimajo znakov prizadetosti kože, kot so urtikarija ali angioedem.

Sistemska mastocitoza je bolezen, kjer pride do klonalne proliferacije morfološko in imunofenotipsko nenormalnih mastocitov, ki se kopičijo v več kot enem organu. Za diagnozo je potreben dokaz skupkov mastocitov v biopsiji kostnega mozga ali katerega koli drugega organa, najpogosteje kože. Poleg tega so diagnostični kriteriji določen imunofenotip mastocitov (CD25+), dokaz aktivirajoče mutacije *cKIT* D816V v krvi ali v kostnem mozgu ter zvišan nivo bazalne triptaze nad 20 ng/ml. Klinična slika je zelo različna in odvisna od stopnje prizadetosti posameznih organov. Najpogostejša oblika je indolentna mastocitoza, pri kateri ima pacient klinično samo simptome povečane aktivnosti mastocitov, redkejše pa so agresivne oblike sistemske mastocitoze, ki napredujejo v levkemijo. Sistemska mastocitoza je redka bolezen, prevalenca v splošni populaciji je ocenjena na 0,96 - 1,3/10.000 odraslih.

Ocenjeno pa je, da ima celo do 7,9 % pacientov z alergijo na čebelji strup sistemsko mastocitozo in 8 - 15 % določeno motnjo v aktivaciji mastocitov, vendar pa ne dosejajo vseh kriterijev za postavitev diagnoze sistemske mastocitoze. Strupi žuželk so tudi najpogostejši vzrok anafilaksije med pacienti z mastocitozo in reakcija je lahko prvi znak bolezni. Natančni mehanizmi za povečano večjo dovzetnost za anafilaktične reakcije na strup žuželk pri teh pacientih zaenkrat niso dokončno znani. Predvideva se, da povečano breme mastocitov privede do večjega sproščanja mediatorjev v primeru pika in da razporeditev mastocitov ob krvnih žilah povzroča neposredni vstop mediatorjev v sistemski krvni obtok. Aktivirajoča mutacija *cKIT* D816V preprečuje apoptozo ter povečuje delitev in diferenciacijo mastocitov. Komponenta strupa žuželk fosfolipaza A2 pa lahko povzroči tudi neposredno sproščanje mastocitnih mediatorjev.

Analiza 153 bolnikov z mastocitozo, ki so v odrasli dobi doživeli pik kožekrilca, je pokazala, da je 54,2 % bolnikov reagiralo s sistemsko reakcijo. Prva sistemska reakcija je bila težka pri 69,9 % bolnikov z mastocitozo. Resnost anafilaksije je domnevno povezana s čezmernim sproščanjem mediatorjev iz mastocitov zaradi velikega števila spremenjenih mastocitov. Do 7,9 % bolnikov z alergijo na strup kožekrilcev ima klonsko bolezen mastocitov. Vendar je bila pogostnost mastocitoze v prejšnjih analizah bolnikov z anafilaksijo zaradi strupa verjetno podcenjena. V prejšnjih študijah pri preiskovancih z normalno bazalno vrednostjo serumske triptaze niso opravili analize kostnega mozga. Nedavne študije so pokazale, da ima veliko bolnikov z alergijo na strup in mastocitozo normalno vrednost bazalne triptaze. Nova občutljiva metoda je omogočila iskanje mastocitoze z določanjem D816V mutacije v genu *KIT* v vzorcu krvi.

Tudi trije nedavni primeri smrti po piku kožekrilca v Sloveniji, so opozorilo, da je potrebna večja pozornost na prisotnost D816V mutacije. Pri vseh treh smrtnih primerih, za katere smo uspeli pridobiti vzorec krvi ali kostnega mozga za analizo, je bila po smrti ugotovljena mutacija D816V gena *KIT*. V splošni populaciji pa je pogostnost te mutacije redka.

#### **Klinični pomen dokazane mutacije D816V gena *KIT* pri pacientih z anafilaksijo**

Trenutne smernice za anafilaksijo se do pacientov z *cKIT* mutacijo še ne opredeljujejo. Glede na dostopne klinične podatke in rezultate študij pa vemo da so pacienti z mutacijo bolj ogroženi za težji potek anafilaksije po piku žuželke, imajo več zapletov med imunoterapijo ter je verjetnost relapsa po zaključku zdravljenja večja. Tudi mejo detekcije za dokaz specifičnih IgE uporabljamo nižjo ( $\geq 0.1$  kU/ml). Priporočamo jim tudi doživljenjsko imunoterapijo, kljub temu pa morajo biti ves čas opremljeni z 2 avtoinjektorjema adrenalina.

#### **Viri**

1. Gülen T, Akin C. Anaphylaxis and Mast Cell Disorders. *Immunol Allergy Clin North Am* [Internet]. 2022 Feb;42(1):45–63.
2. Sturm GJ, Varga E-M, Roberts G, Mosbech H, Bilò MB, Akdis CA, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy* [Internet]. 2018 Apr;73(4):744–64. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/all.13262>
3. Sturm GJ, Varga E-M, Roberts G, Mosbech H, Bilò MB, Akdis CA, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2018 Apr;73(4):744–64.
4. Stoevesandt J, Sturm GJ, Bonadonna P, Oude Elberink JNG, Trautmann A. Risk factors and indicators of severe systemic insect sting reactions. *Allergy*. 2020 Mar 16;75(3):535–45.
5. Ruëff F, Przybilla B, Biló MB, Müller U, Scheipl F, Aberer W, et al. Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: Importance of baseline serum tryptase - a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Nov;124(5):1047–54.

6. Alvarez-Twose I, González-De-Olano D, Sánchez-Munoz L, Matito A, Jara-Acevedo M, Teodosio C, et al. Validation of the REMA score for predicting mast cell clonality and systemic mastocytosis in patients with systemic mast cell activation symptoms. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012 Feb;157(3):275–80.
7. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2019 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol.* 2019 Mar;94(3):363–77.
8. Košnik et al: Dogovor o obravnavi anafilaksije, Golnik, SZD 2015



## Molekularno genetske preiskave C-KIT

*Sandra Šučurović*

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

*sandra.sucurovic@kclj.si*

Gen *KIT* kodira protein, ki je transmembranski receptor s tirozin kinazno aktivnostjo. Njegov aktivator je citokin, ki je dejavnik matičnih celic (SCF, stem cell factor), ki z vezavo na receptor *KIT* aktivira signalne poti MAPK/ERK, PI3K/AKT, JAK/STAT ter s tem regulira številne celične procese, kot so: razmnoževanje, preživetje, apoptoza, adhezija in angiogeneza. Strukturno *KIT* vsebuje ekstracelularno domeno s petimi imunoglobulinom (Ig) podobnimi domenami, tri od petih tvorijo SCF-vezavno mesto, transmembransko domeno in intracelularno domeno, ki je sestavljena iz jukstamembranske domene, ki ima regulatorno vlogo (represor kinazne aktivnosti) in tirozin kinazne domene z dvema katalitičnima funkcionalno aktivnima domenama, ločenima z insercijo dolgo 80 aminokislin (1, 2).

V hematopoezi receptor *KIT* sodeluje pri samoobnavljanju krvotvorne matične celice ter pri diferenciaciji v mieloidno in limfoidno vrsto. Izražanje gena *KIT* se zmanjšuje z diferenciacijo krvotvornih celic, vendar ostaja močno izražen v mastocitih in dendritičnih celicah (3).

Gen *KIT* je pri rakavih obolenjih (hematoloških, gastrointestinalnih, melanomih) pogosto mutiran. Somatske različice praviloma vodijo v pridobitev funkcije, ki povzroči od liganda SCT neodvisno fosforilacijo intracelularne domene in konstitutivno aktivacijo signalizacije. Pri hematoloških obolenjih je gen *KIT* najbolj pogosto mutiran pri mastocitozi (> 90 % bolnikov) ter akutni mieloični levkemiji (AML) in sicer pri približno 4–6 % odraslih bolnikov z novoodkrito AML in 20–40 % odraslih bolnikov z novoodkrito CBF-AML (3).

Mehanizem konstitutivne aktivacije receptorja *KIT* je pri > 90 % bolnikov s sistemsko mastocitozo (SM) pojasnjen z obstojem somatskih aktivacijskih točkovnih mutacij, ki se nahajajo v eksonu 17 gena *KIT*, kjer se nahaja katalitična domena receptorja. Najpogostejša različica v genu *KIT*, najdena v SM, je različica p.D816V, ki je sestavljena iz zamenjave asparaginske kisline z valinom na položaju 816 proteinskega receptorja (4). Pri AML se različice v genu *KIT* skoraj izključno pojavljajo v eksonu 8 in eksonu 17. V eksonu 17 sta najbolj pogosti različici p.D816V ali p.N822K (3). Različice v *KIT* so tarče za zdravljenje s tirozin kinaznimi inhibitorji (TKI). Prva generacija TKI učinkuje pri prekomernem izražanju divjega tipa, prisotnosti različic v eksonu 11 gena *KIT* ter pri gastrointestinalnih rakavih obolenjih, pri katerih se 80–90 % bolnikov odziva na zdravljenje.

Različice v kinazni domeni (tudi p.D816V) so rezistentne na zdravljenje s prvo generacijo TKI. TKI naslednjih generacij učinkujejo tudi na različice v kinazni domeni, odvisno od specifične lastnosti posameznih TKI (5).

V Specializiranem hematološkem laboratoriju, UKC Ljubljana, izvajamo preiskavo za določitev prisotnosti različice p.D816V v genu *KIT*. Različico določamo s preiskavo alelno specifični PCR, pri kateri je občutljivost reakcije 1 mutirana celica na 100 normalnih ( $10^{-2}$ ). Vzorec izbire za analizo prisotnosti različice pri mastocitozi je kostni mozeg. V primeru ko v analizo dobimo vzorec venske krvi preiskavo sicer izvedemo, vendar pri negativnem rezultatu podamo opozorilo, da gre lahko za lažno negativen rezultat, ker gre za suboptimalni vzorec ter prosimo za odvzem kostnega mozga. Razlog temu je lahko tudi majhno tumorsko breme v vzorcu venske krvi ali premajhna občutljivost metode. Ostale različice v genu *KIT* lahko zaznamo s sekvenciranjem naslednje generacije (NGS).

## Viri

1. Villaespesa MP, Twose IA. Systemic Mastocytosis: Following the Tyrosine Kinase Inhibition Roadmap. *Front Pharmacol.* 2020;14;11:443.
2. Lennartsson J, Rönstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications *Physiol Rev.* 2012;92(4):1619-49.
3. Katagiri S, Chi S, Minami Y, Fukushima K, Shibayama H, Hosono N, et al. Mutated KIT Tyrosine Kinase as a Novel Molecular Target in Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9):4694
4. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, Metcalfe DD. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995;92:10560–10564.
5. Babaei MA, Kamalidehghan B, Saleem M, Huri Z, Ahmandipour F. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des Devel Ther.* 2016;1(10):2443-59.

## Genetski vzrok za povišano bazalno triptazo

*Matija Rijavec, Julij Šelb, Manca Svetina, Peter Kopač, Mitja Košnik, Peter Korošec*

*Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergologijo Golnik, Klinika Golnik*

*matija.rijavec@klinika-golnik.si*

### Triptaze

Triptaze so serinske proteaze, ki jih skoraj izključno izločajo mastociti, v manjši meri tudi bazofilci. Le-ti so ključne efektorske celice pri z IgE posredovani anafilaksiji. Iz pro-triptaz preko zaporednih proteolitičnih cepitev nastane zrela tetramerna triptaza, ki je shranjena v granulah mastocitov. Pro-triptaze se lahko tudi konstitutivno izločajo v serum kot encimsko neaktivni pro-peptidi. Poznamo tri topne oblike triptaz ( $\alpha$ ,  $\beta$  in  $\delta$ ) in eno triptazo ( $\Upsilon$ ) vezano na membrano, vendar natančna vloga različnih triptaz še ni znana. Večina testov meri skupno triptazo, ki je vsota zrele in pro-oblik  $\alpha$ - in  $\beta$ -triptaz. Pri bolnikih z anafilaktično reakcijo je potrebno ločevati med koncentracijo triptaze med samo reakcijo (ob degranulaciji mastocitov) in med koncentracijo bazalne triptaze (ni degranulacije mastocitov). Glavna razloga za povišano bazalno triptazo (nad 11,4 ng/mL) sta klonalne bolezni mastocitov (večinoma posledica pridobljene aktivirajoče različice p.D816V v genu *KIT*) in dedna  $\alpha$ -triptazemija (posledica prirojenih podvojitev gena *TPSAB1*).

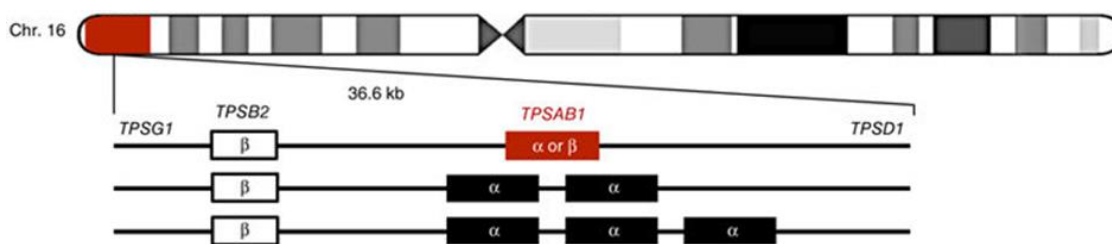
### Dedna $\alpha$ -triptazemija

Dedna  $\alpha$ -triptazemija (H $\alpha$ T, angl. hereditary alpha tryptasemia) je genetska lastnost, ki je posledica presežnih kopij gena *TPSAB1*, ki kodira  $\alpha$ -triptazo, kar vodi do povišane koncentracije bazalne triptaze v serumu. Dedovanje je avtosomno dominantno, s popolno penetranco, tako da imajo skoraj vse osebe s H $\alpha$ T povišano koncentracijo bazalne triptaze (običajno nad 8 ng/mL). H $\alpha$ T je prisotna v 4-6 % splošne populacije, in tako predstavlja najpogostejši vzrok za povišano koncentracijo bazalne triptaze v serumu, saj je H $\alpha$ T prisoten pri ~90 % posameznikov iz splošne populacije s povišano bazalno triptazo.

Simptomi H $\alpha$ T so raznoliki in dokaj nespecifični, veliko oseb s H $\alpha$ T je tudi brez kakršnihkoli simptomov. Najpogostejši simptomi pri H $\alpha$ T so kronična srbečica/rdečica, gastrointestinalne težave, ohranjena primarna denticija, sistemska reakcija (anafilaksija) po pikih kožekrilcev in mastocitoza. Številne raziskave so potrdile, da je H $\alpha$ T pomemben dejavnik tveganja predvsem za sistemske reakcije po pikih kožekrilcev in mastocitozo.

## Genetika triptaznega lokusa

Genetika človeškega triptaznega lokusa je kompleksna. Locus je sestavljen iz štirih paralognih genov (*TPSG1*:  $\gamma$ -triptaza, *TPSB2*:  $\beta$ 2-3-triptaza, *TPSAB1*:  $\alpha/\beta$ 1-triptaza in *TPSD1*:  $\delta$ -triptaza), ki se nahajajo v nestabilni subteloemerni regiji (p13.3) kromosoma 16 (Slika 1). Čeprav vsi ti geni kodirajo triptaze, samo gena *TPSB2* in *TPSAB1* kodirata štiri glavne izomerne oblike ( $\beta$ 1 ( $\beta$ ),  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 in  $\alpha$ ), ki predstavljajo glavno, biološko pomembno triptazo, ki jo običajno merimo kot triptazo v serumu. Gen *TPSB2* kodira samo  $\beta$ -triptazo, medtem ko *TPSAB1* nosi zapis bodisi za izoobliko  $\alpha$  ali  $\beta$ . Ker so posamezne izooblike izjemno podobne (več kot 97 % podobnost), je razlikovanje med različnimi izooblikami izjemno težavno.



**Slika 1:** Grafični prikaz triptaznega lokusa na kromosomu 16p13.3.

Do nedavnega je veljalo, da imajo posamezniki po eno kopijo *TPSB2* in *TPSAB1*. Najpogostejši genotipi *TPSAB1* so  $\alpha/\alpha$ ,  $\alpha/\beta$  in  $\beta/\beta$ , medtem ko sta na *TPSB2* prisotni dve dodatni kopiji  $\beta$ -triptaze. Posamezniki z genotipom  $2\alpha:2\beta$  ( $\alpha,\beta/\alpha,\beta$ ) imajo dve kopiji  $\alpha$ -triptaze na nasprotnih alelih (po ena kopija podedovana od vsakega starša), kar ne predstavlja povečanega števila kopij *TPSAB1*. Približno 5 % oseb pa podeduje dodatne kopije zaporedij, ki kodirajo  $\alpha$ -triptazo na istem alelu (duplikacija ( $\alpha\alpha$ ), triplikacija ( $\alpha\alpha\alpha$ )), kar privede do povišane bazalne triptaze v serumu in H $\alpha$ T.

## Genotipizacija triptaznega lokusa

Zaradi zapletene genetske strukture, prisotnosti zaporedij z visokim deležem GC, in velike podobnosti med zaporedji, ki kodirajo izooblike  $\alpha$ -triptaze in  $\beta$ -triptaze, ter prisotnosti več paralogov na enem lokusu, je natančna določitev števila kopij posamezne izooblike na triptaznem lokusu tehnično zahtevna. Zaradi te strukturne kompleksnosti in podobnosti zaporedij je sekvenciranje nove generacije (angl. next-generation sequencing, NGS) omenjenega lokusa težavno, podobno kot tudi razlikovanje med različnimi izooblikami triptaz na proteinski ravni. Kot rešitev za zahtevno genotipizacijo triptaznega lokusa so Lyons in sodelavci razvili metodo, ki s pomočjo digitalnega kapljičnega PCR (ddPCR, angl. Digital Droplet PCR), omogoča natančno

določitev števila kopij gena *TPSAB1*. Z omenjeno metodo tudi v Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko Klinike Golnik s pomočjo ddPCR QX200 (Bio-Rad) direktno kvantificiramo število kopij  $\alpha$ -triptaze in  $\beta$ -triptaze s pomočjo specifičnih oligonukleotidov in sond za  $\alpha$ - in  $\beta$ -triptazo.

Dedna  $\alpha$ -triptazemija je posledica presežnih kopij gena *TPSAB1*, ki kodira  $\alpha$ -triptazo, in je najpogostejši vzrok povišane koncentracije bazalne triptaze v serumu. Dedna  $\alpha$ -triptazemija je prisotna pri približno 5 % populacije z raznolikimi in nespecifičnimi simptomi in predstavlja pomemben dejavnik tveganja za anafilaksijo po pikih kožekrilcev in mastocitozo.

## Viri

1. Lyons JJ. Hereditary Alpha Tryptasemia. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2018;38:483–495.
2. Košnik M, Rijavec M, Šelb J, Korošec P. Genetski razlogi za anafilaksijo. In: Fras Z, Košnik M, ur. Izbrana poglavja iz interne medicine 2021: univerziteni učbenik. Ljubljana : Medicinska fakulteta, Katedra za interno medicino : Slovensko zdravniško društvo, 2021. p. 169-177.
3. Glover SC, Carter MC, Korošec P, Bonadonna P, Schwartz LB, Milner JD, et al. Clinical relevance of inherited genetic differences in human tryptases. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2021; 127(6):638-647.
4. Luskin KT, White AA, Lyons JJ. The Genetic Basis and Clinical Impact of Hereditary Alpha-Tryptasemia. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021;9:2235–2242.
5. Kačar M, Rijavec M, Šelb J, Korošec P. Clonal mast cell disorders and hereditary  $\alpha$ -tryptasemia as risk factors for anaphylaxis. *Clin Exp Allergy.* 2023. doi: 10.1111/cea.14264.
6. Lyons JJ, Yu X, Hughes JD, Le QT, Jamil A, Bai Y, et al. Elevated basal serum tryptase identifies a multisystem disorder associated with increased TPSAB1 copy number. *Nat Genet.* 2016;48(12):1564–9.
7. Lyons JJ, Chovanec J, O’Connell MP, Liu Y, Šelb J, Zanotti R, et al. Heritable risk for severe anaphylaxis associated with increased  $\alpha$ -tryptase–encoding germline copy number at TPSAB1. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;147(2):622–32.
8. Šelb J, Rijavec M, Eržen R, Zidarn M, Kopač P, Škerget M, et al. Routine KIT p.D816V screening identifies clonal mast cell disease in patients with Hymenoptera allergy regularly missed using baseline tryptase levels alone. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;148(2):621-6.
9. Šelb J, Rijavec M, Kopač P, Lyons JJ, Korošec P. H $\alpha$ T is associated with increased risk for severe Hymenoptera venom-triggered anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2023;151(3):804-805.

## Kožna mastocitoza

Olga Točkova

Dermatovenerološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana

olga.tockova@kclj.si

Mastocitoze so skupina bolezni, za katere je značilno pretirano kopičenje mastocitov v enem ali več različnih tkivih. Bolezen je klinično heterogena in jo delimo na kožno mastocitozo (KM), kjer je prizadeta le koža; in sistemsko mastocitozo (SM), kjer je prizadet najmanj en notranji organ, s prizadetostjo kože ali brez.

KM se lahko pojavlja v obliki makulopapulozne kožne mastocitoze (urtikaria pigmentosa), difuzne prizadetosti kože (difuzna kožna mastocitoza) ali kožnega mastocitoma. Telangiectasia macularis eruptiva persistans sedaj spada v makulopapulozno obliko.

Po novejši razdelitvi v SM sodijo indolentna sistemska mastocitoza, tleča SM, sistemska mastocitoza s pridruženo ne-mastocitno hematološko klonalno boleznijo, (vključno z mastocitozo v kostnem mozgu), agresivna SM, mastocitna levkemija, mastocitni sarkom ter mastocitom v drugem organu.

Mastocitoza je redka motnja, s prevalenco 1/10.000. Večinoma zbolijo otroci do treh let, večje število bolnikov pričakujemo tudi v starostni skupini po 15.letu. Najpogostejša oblika pri otrocih je KM, ki predstavlja približno 90% primerov v skupini do 18 let. S kožno obliko zboli manj kot 5% vseh odraslih bolnikov.

Večina prizadetih otrok razvije kožno simptomatiko že v prvem letu življenja, oziroma so lezije prisotne ob rojstvu. Izboljšanje ali popolno regresijo bolezni pričakujemo do/v puberteti.

Patogeneza vseh oblik mastocitoz je posledica tako kroničnega kot sporadičnega sproščanja mediatorjev iz mastocitov, ki se kopičijo v enem ali več tkivih. V mastocitih so shranjene različne biološko aktivne snovi, kot so histamin, triptaza, heparin, različni citokini. Pod vplivom notranjih in/ali zunanjih dejavnikov pride do njihove aktivacije. Nastanejo simptomi in znaki, kot so zardevanje, srbečica, glavobol, omotičnost, hipotenzija, sinkopa, tahikardija, slabost, bruhanje, driska, bolečine v trebuhu, celo anafilaksija.

Nastanek mastocitoze povezujemo z različicami v genu za tirozin kinazni receptor, *c-KIT*. Pri več kot 90% odraslih bolnikov s SM gre za različico mutacije D816V, ki je vidna tudi pri posameznikih

s kožno obliko bolezni. Pri otrocih je pogostost te različice manjša, pri približno 40% bolnikov najdemo druge različice.

Najpogostejša je makulopapulozna oblika KM (urtikarija pigmentoza), ki predstavlja 70 do 90% vseh pediatričnih primerov. Za bolezen je značilen pojav posameznih ali številnih, polimorfnih, rumeno rjavkastih do rdeče rjavih makulopapuloznih vzbrsti. Redko vidimo noduse ali plake, ki lahko varirajo v velikosti. Vzbrsti se pojavljajo na okončinah in trupu - obraz, dlani in stopala so praviloma brez sprememb. Spontano ali po mehanskem draženju (drgnjenju) postanejo vzbrsti rdeče, otečene in srbeče oziroma na nastane urtika, kar opišemo kot pozitiven Darierjev znak. Nastajajo lahko tudi mehurji, še posebej pri dojenčkih. Večina otrok je brez drugih kliničnih simptomov, lahko pa se pojavi zardevanje in srbež.

Poleg polimorfne oblike makulopapulozne mastocitoze, je možna tudi monomorfna klinična različica. Pogostejša je pri odraslih, pri otrocih so le redko vidne manjše, do 3 mm velike monomorfne lezije.

V odrasli dobi so poleg kožnih sprememb pogostejši sistemski simptomi, ki so posledica delovanja mastocitnih mediatorjev. Pri večini odraslih bolnikov je kožna simptomatika manifestacija sistemske bolezni - približno 80% odraslih pacientov s SM ima monomorfno makulopapulozno obliko. Otroci z monomorfnimi lezijami imajo večje tveganje za nastanek SM, zlasti če se lezije razvijejo pozneje v otroštvu ali po puberteti.

Med makulopapulozne oblike spada posebna klinična različica teleangiectasia macularis eruptiva persistans, ki se pojavlja praviloma pri odraslih s številnimi rjavo rdečkastimi makulami ali zlivajočimi se plaki s teleangiektazijami. Bolezen ima kroničen potek in redko preide v sistemsko obliko.

Za solitarni mastocitom, ki prizadene 10 do 15 odstotkov otrok s kožno mastocitozo, je značilen eden do trije rdečkasto rjavi nodusi ali plaki, ki so prisotni že od rojstva ali se pojavijo v prvih mesecih življenja. Spontano involucijo pričakujemo pred puberteto. Sistemski znaki so redki, bolniki nimajo povečanega rizika za razvoj SM.

Pri 1-3% bolnikov se kožna mastocitoza lahko kaže v obliki difuzne prizadetosti kože, ki je skoraj vedno prisotna le v otroški dobi. Koža celega telesa je infiltrirana, zadebeljena in edematozna, rumeno rdeče barve s poudarjenimi kožnimi gubami. Spremembe so prisotne že ob rojstvu ali nastanejo v prvem letu. Pri dojenčkih se lahko izrazi kot bulozna mastocitoza. Spontano ali pod vplivom sprožilnih dejavnikov se pojavijo mehurji na koži oziroma sistemski znaki.

SM je v otroški dobi redka bolezen, pojavlja se pri manj kot 10% pediatričnih bolnikov. Vidne so makulopapulozne spremembe, ki so majhne in enotne. Običajno je SM indolentna, redke so napredovale in agresivne oblike.

Pri 60% odraslih bolnikov z indolentno SM je prisotna urtikarija pigmentoza. Kožna simptomatika spremlja okoli 40% bolnikov z agresivno sistemsko mastocitozo, pri mastocitni levkemiji ali izolirani mastocitozi kostnega mozga pa je ta praviloma odsotna.

Prognoza kožne mastocitoze je zelo dobra, zlasti pri otrocih je pogosta spontana regresija. V kolikor vzbrsti vztrajajo po puberteti, je verjetnost prehoda v SM večja.

Za postavitev diagnoze kožne mastocitoze so izdelani natančni diagnostični kriteriji. Pri bolniku je diagnoza možna le v primeru prisotnosti kožnih lezij s tipično klinično sliko. V nejasnih primerih mora biti diagnoza histopatološko potrjena, ob odsotnosti kriterijev za SM.

Diagnozo kožne mastocitoze večinoma postavimo klinično, zato sta zelo pomembna natančna anamneza in klinični pregled, pri katerih upoštevamo zgoraj naštet merila.

Med kliničnim pregledom je potrebno poleg kožnih lezij opredeliti prisotnost kliničnih znakov, ki bi nakazovali mastocitno infiltracijo drugih organskih sistemov.

Pri obravnavi bolnika so potrebne laboratorijske preiskave, vsem bolnikom je potrebno določiti tudi nivo triptaze v serumu (pri kožnih oblikah je običajno normalen). Pomembno je, da lahko tudi do 10% (odraslih) bolnikov s SM (z/brez kožnih manifestacij) normalen serumski nivo triptaze. Pri sumu na SM opravimo dodatno diagnostiko, za izključitev prizadetosti notranjih organov.

Zdravljenje mastocitoze je individualno, glede na prizadetost organa in simptome.

Bolnikom svetujemo izogibanje sprožilnim dejavnikom aktivacije mastocitov, predvsem drgnjenju kože, nenadnim spremembam temperature, stresu, vbodom žuželk in kač, uživanju alkohola, začinjeni hrani ter drugim morebitnim sprožilcem, ki so jih sami odkrili. Potrebno je poznati tveganje in se izogibati zdravilom, ki lahko povzročijo aktivacijo mastocitov: npr. acetylsalicilni kislini, nesteroidnim antirevmatikom, kodeinu, morfinu, rentgenskim kontrastnim sredstvom, nekaterim mišičnim relaksansom, splošnim anestetikom, analgetikom.

Pri blagih kožnih oblikah mastocitoze zadostuje topikalno kortikosteroidno zdravljenje. Sistemski antihistaminiki zmanjšajo srbečico in zardevanje, koristni pa so predvsem pri bolnikih s pridruženimi urtikarijo, dermografizmom, alergijskim rinitisom ali drugimi atopijskimi boleznimi. Starejše otroke in odrasle bolnike s težjo obliko bolezni, ki ne odreagirajo na intenzivno lokalno terapijo, lahko zdravimo s fototerapijo. Bolnike s sumom/potrjeno diagnozo SM obravnavamo multidisciplinarno.



## Viri

1. Horny HP, Akin C, Arber DA, et al. Mastocytosis. In: WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues, Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al (Eds), IARC Press, Lyon 2017. p.62.
2. Brockow K. Epidemiology, prognosis, and risk factors in mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2014; 34:283.
3. Méni C, Bruneau J, Georgin-Lavialle S, et al. Paediatric mastocytosis: a systematic review of 1747 cases. *Br J Dermatol* 2015; 172:642.
4. Wolff K, Komar M, Petzelbauer P. Clinical and histopathological aspects of cutaneous mastocytosis. *Leuk Res* 2001; 25:519.
5. Liang J, Wu YL, Chen BJ, Zhang W, Tanaka Y, Sugiyama H. The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9(5):435-43.
6. Berezowska S, Flaig MJ, Ruëff F, et al. Adult-onset mastocytosis in the skin is highly suggestive of systemic mastocytosis. *Mod Pathol* 2014; 27:19.
7. Zanotti R, Simioni L, Garcia-Montero AC, et al. Somatic D816V KIT mutation in a case of adult-onset familial mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131:605.
8. Castells M, Austen KF. Mastocytosis: mediator-related signs and symptoms. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127:147.

# HEMATOLOGIJA IN HEMATOLOGIJI SORODNE TEME (SMSZT)

## Pomen higiene rok

*Sergeja Gregorčič*

*Služba za preprečevanje in obvladovanje bolnišničnih okužb, Univerzitetni klinični center Ljubljana*

*sergeja.gregorcic@kclj.si*

### Uvod

Umivanje rok spremlja človeštvo kot del osebne higiene, v preteklosti predvsem v povezavi z verskimi in kulturnimi običaji. Znanstvene temelje higieni rok je v sredini 19. stoletja postavil Ignaz Semmelweis, ki je umivanje rok s klorirano apneno vodo pred porodom iz babiškega okolja prenesel k zdravnikom. S tem ukrepom je smrtnost porodnic zaradi poporodne okužbe v obeh okoljih izenačil, z izhodiščno nižjo smrtnostjo pri babicah. Umivanje rok kot pomemben ukrep preprečevanja prenosa okužb je uradno priznanje v zdravstvu pridobilo pozno, v 80' letih prejšnjega stoletja, z objavo prvih smernic v Združenih državah Amerike (ZDA), katerim so sledile druge države in posodobitve. V letih 1995 in 1996 je Ameriški center za nadzor nad nalezljivimi boleznimi (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) /Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) ) v ZDA umivanju rok z vodo in milom pridal možnost umivanja rok z antiseptičnimi raztopinami. Z letom 2002, ko so v posodobljenih smernicah HICPAC v zdravstvu pričeli s promoviranjem razkuževanja rok z alkoholnimi razkužili, se je oblikoval pojem higiena rok kot nadpomenka za umivanje, razkuževanje in kirurško umivanje. Danes pojem higiena rok vključuje tudi urejenost in nego rok. Didier Pittet je bil, po uspešno zaključenem multimodalnem projektu preprečevanja bolnišničnih okužb v ženevski bolnici v začetku tega stoletja, povabljen k sodelovanju s Svetovno zdravstveno organizacijo (SZO). Skupaj so oblikovali model kritičnih petih trenutkov higiena rok, ki se danes uporablja po celem svetu pod sloganom »Save Lives: Clean Your Hands« z vsakoletno promocijsko kampanjo.

### Z zdravstveno oskrbo povezane okužbe

Z zdravstveno oskrbo povezane okužbe predstavljajo veliko breme zaradi povečane obremenitve zdravstvenega sistema, morbidnosti in mortalitete pacientov, zato so potrebni in smiselni vsi ukrepi za preprečevanje okužb. Zadnja prevalenčna raziskava bolnišničnih okužb v evropskih

državah v letu 2017 je prikazala, da je vsakodnevno v bolnišnični obravnavi pri enem pacientu od petnajstih prisotna vsaj ena bolnišnična okužba; od teh naj bi jih bila polovica preprečljivih. Med splošnimi previdnostnimi ukrepi, pojmovanimi tudi standardni ukrepi, pod katerimi so zajete vse enotne aktivnosti v diagnostiki, zdravljenju in rehabilitaciji pacientov z namenom preprečevanja okužb, je higiena rok ključna. Higiena rok je preprosta, hitra, učinkovita in kadar izvajamo razkuževanje, izvedljiva brez infrastrukturnih omejitev.

### Urejenost rok

Za učinkovito izvajanje higiene rok je pomembno, da je koža rok nepoškodovana in roke urejene. K urejenosti sodijo kratko postrizeni nohti, dolžina nohta naj ne presega jagodice prsta, nanosov na nohtih in nakita. Umetni nohti so bili prepoznani kot dejavniki tveganja pri prenosu bolnišničnih okužb. Dokazano se pod njimi pogosteje zadržujejo po Gramu negativne bakterije, zato so pri zdravstvenem osebju odsvetovani. O geliranih nanosih na nohtih jasnih dokazov, ki bi podpirali varno uporabo ni. Ameriško združenje za bolnišnično epidemiologijo (Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) in Ameriško združenje za infekcijske bolezni Infectious Diseases Society of America (IDSA) sta v tem kontekstu zavzeli varno stališče s konservativnim pristopom, da se gelirani nanosi obravnavajo kot umetni nohti in naj se ne nosijo v visoko rizičnih okoljih (enote intenzivne terapije, operacijske dvorane, oddelki z novorojenci in imunsko oslabeledimi bolniki). V kolikor smo z doslednostjo pri higieni rok odlični, so tudi tukaj dovoljena širša odstopanja.

### Razkuževanje rok

V zdravstvu zaradi prihranka časa, prijaznosti do kože in večje učinkovitosti, roke prednostno razkužujemo. V ta namen uporabljamo razkužilna sredstva s 60-85 % vsebnostjo alkohola. Za učinkovito razkuževanje potrebujemo 3 ml razkužila. Bolj kot tehnika izvedbe razkuževanja, je pomembno, da zaobjamemo celotno površino rok. Najbolj kritična so področja medprstnih prostorov, jagodice prstov in palec. Obvezno roke umijemo, kadar so vidno umazane, umivanje ima prednost pri ravnanju s pacienti, ki prebolevajo virusne gastroenteritise. Umivanju sledi razkuževanje, kadar imamo opravka s prisotnostjo *Clostridioides difficile*.

### Pet trenutkov za higieno rok

Znotraj zdravstva je za preprečevanje prenosa mikroorganizmov ključnih pet priložnosti:

- Pred stikom z bolnikom
- Po stiku z bolnikom
- Po stiku s pacientovo okolico

- Pred aseptičnimi posegi
- Po potencialnem stikom z izločki (Rokavice ne nadomeščajo higiene rok!)

Na podlagi teh trenutkov je oblikovan kazalnik kakovosti higiene rok, kjer opazovalci ocenjujejo doslednost izvajanja. Za zagotavljanje varnega okolja je zaželena vsaj 80 % doslednost.

### **Uporaba rokavic**

Zaščitne (preiskovalne) rokavice ne nadomeščajo higiene rok. Vedno si roke razkužimo pred nameščanjem in po snemanju rokavic. Uporabljamo jih pred možnim ali pričakovanim stikom s pacientovimi izločki ter v namene zagotavljanja kontaktne izolacije. Zaradi pojava mikroperforacij ob uporabi, je priporočen čas nošenja do 20 min.

### **Zaključek**

Higiene rok je najpomembnejši in najpreprostejši ukrep preprečevanja širjenja mikroorganizmov. Z doslednim in pravilnim izvajanjem higiene rok prispevamo k varnemu delovnemu okolju in zmanjševanju bremena z zdravstvom pogojenih okužb. Samo poznavanje higiene rok še ne prinese rezultatov, saj je njena učinkovitost celosten odraz znanja, odnosa, vedenja in prepričanja v določenem okolju.

### **Viri**

1. Bjerke NB. The evolution: Handwashing to hand hygiene guidance. Crit Care Nurs. 2004; 27(3):295-307.
2. Jewellery and Nail Polish Worn by Health Care Workers and the Risk of Infection Transmission: A Review of Clinical Evidence and Guidelines. Ottawa: CADTH(CADTH rapid response report: summary with critical appraisal); 2017.
3. Mathur P. Hand hygiene: back to the basics of infection control. Indian J Med Res. 2011;134(5):611-20.

## Gradnje in zaščita

*Tanja Štraus*

*Služba za preprečevanje in obvladovanje bolnišničnih okužb, Univerzitetni klinični center  
Ljubljana*

*tanja.straus@kclj.si*

### Uvod

Vsaka zdravstvena ustanova mora pri prenovah ali novogradnjah upoštevati slovenske prostorske tehnične smernice (TSG-12640-001: 2008), ter njihove dopolnitve, ki so bile sprejete 2021. Prostorsko tehnične smernice so razdeljene v štiri področja in sicer: splošni del, bolnišnični del, zdravstveni domovi in zavod za zdravstveno varstvo (Ministrstvo za zdravje, 2008).

Najpomembnejše je upoštevanje velikosti prostorov, da ne prihaja do križanja čistih in nečistih poti, zadostni razmak med posteljami, pravilno odločanje in svetovanje pri izgradnjah izolacijskih sob, dovolj veliki prostori za paciente, pravilna izbira materialov, ki se lahko čistijo in razkužujejo, primerna urejenost sanitarnih prostorov, dovolj ustreznih ločenih skladiščnih prostorov za shranjevanje čistih in nečistih pripomočkov in opreme, nečisti prostor za odpadke. Pomembno je, da se v pripravljene načrte vnese tudi navodila glede zaščite pri izvajanju gradenj oziroma adaptacij v zdravstvenih ustanovah. V Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana imamo za ta namen pripravljen obrazec »Zaščitni ukrepi pri izvajanju gradbenih del«, ki ga morajo izvajalci pri delih dosledno upoštevati (SPOBO, 2013).

### Glive

Glive se nahajajo v zunanjem in notranjem okolju, nahajajo se v različnih gradbenih materialih. Nosilci virusov, bakterij in gliv smo lahko tudi ljudje, žuželke in živali. Glive so sposobne rasti na skoraj vseh naravnih in sintetičnih materialih, še zlasti se najbolj razvijajo v vlažnem okolju. Dobro gojišče za *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus versicolor* je anorganski material (Samet&Spengler, 2003). V bolnišničnem okolju je še posebej pomembno vzdrževanje klimatskih in prezračevalnih naprav, saj so ti lahko vir okužb za paciente. Ugotovljeno je, da ljudje kar 80% časa preživimo v notranjih prostorih, bodisi da gre za bivalne ali delovne prostore (Bernstein et al., 2008).

Glive na človeka vplivajo na tri načine: v obliki okužb (mikoze), zaradi toksičnih učinkov mikotoksinov, ki jih nekatere vrste izločajo v okolje in v obliki preobčutljivostnih reakcij na njihove

alergene. Mikotoksini so različni sekundarni metaboliti, ki jih ob rasti in razmnoževanju izločajo glive (Soroka, et al., 2008). Toksigene glive so izolirali iz gradbenega materiala in zraka v vlažnih stavbah, ko so pri prebivalcih opazili povečano število določenih kliničnih znakov kot so kašelj, draženje kože, sluznic oči in dihal, glavobol, utrujenost. To lahko kaže na povezavo med mikotoksini v zraku in slabšim zdravjem izpostavljenih (Bonetta, et al., 2010). Najpogostejše glive, ki so prisotne v bivalnem okolju in zunanjem okolju so glive iz rodu *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* in *Aspergillus*. Na njihovo rast vpliva predvsem prisotnost vode in vlage ter slaba izolacija stavb, kondenz in ne nazadnje neustrezno prezračevanje (Méheust, et al., 2014). Zaradi vseh teh dejavnikov je potrebno spremljati mikroklimatske pogoje kot so temperatura, relativna vlažnost in prezračevanje (Pasquarella, et al., 2012). Vzorčenje zraka je zaenkrat najpogostejša metoda za ugotavljanje prisotnosti gliv v prostoru, predvsem v bolnišničnih okoljih, kjer je preprečevanje glivnih okužb izrednega pomena (Muiioz, et al., 2001; Schulster, et al., 2004). Glivne bolnišnične okužbe so dokaj pogoste in se hitro širijo. Zdravljenje je dolgotrajno in se lahko konča tudi s smrtjo. Pacienti lahko pridobijo bolnišnično okužbo neposredno iz bolnišničnih prostorov, tekom zdravljenja v bolnišnici. Vir spor so okrasne rastline, cvetje, razpadajoči organski material, sveže sadje, voda in gradbena dela v okolici bolnišnice (Kordbachen, et al., 2005).

## Legionela

Različna vodna okolja so naravni življenjski prostor legionel. Legionela je tip bakterije, ki je prisotna v vodi in v zemlji. Dobre pogoje za razmnoževanje legionele predstavljajo vodovodni sistemi, še posebej slepi vodi. V manj pretočnih pipah pride do zastajanja vode, legionele pa okrog svoje kolonije ustvarijo biofilm, ki deluje kot zaščita za bakterije.

Najugodnejša temperatura za razmnoževanje legionel je med 25°C in 42°C. V kolikor želimo preprečevati njihovo razmnoževanje, rast in širjenje v vodovodnem sistemu mora biti temperatura vode ali nad 50°C, ali pod 20°C, (Hojs, et al., 2002).

Služba za preprečevanje in obvladovanje bolnišničnih okužb (SPOBO) Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana ima napisana priporočila oziroma navodila ob adaptaciji ali gradnji, katera vključujejo posege v vodovodno omrežje ustanove.

## Bakterije

*Pseudomonas aeruginosa* je tudi lahko bolnišnična okužba. Je gram negativna paličasta bakterija s kapsulo, ki lahko povzroči bolezen pri človeku, rastlinah in živalih. PAE je razširjenja, ter lahko povzroča bolnišnične okužbe kot so pljučnica zaradi umetnega predihavanja in sindrome

povezane s sepsa, saj izkazuje odpornost proti številnim antibiotikom. Velja za priložnostnega povzročitelja saj hujše okužbe povzroča pri posameznikih s prisotnimi boleznimi, kot sta cistična fibroza ali hude opekline (Diggle & Whiteley, 2020).

## Zaključek

Osnova za smiselne ukrepe pri gradnjah je priprava ocene tveganja za paciente in ocene tveganja s strani izvajalcev gradbenih del. Določiti je potrebno pristojnosti in odgovornosti pri izvajanju gradbenih del, ter določiti odgovorne osebe za nadzor nad upoštevanjem zaščitnih ukrepov. Zaposlene je potrebno seznaniti s tveganji za prenos in pojav okužb v ustanovi in podajati jasna navodila za preprečevanje in obvladovanje okužb povezanih z zdravstvom. Zagotoviti je potrebno, da vsi zaposleni poznajo navodila in opravljajo zadolžitve svojega delokroga v skladu s predpisi dela ter oceno tveganja s strani bolnikov in posegov. V prvi vrsti moramo v bolnišnici poskrbeti za varnost pacientov in svojih zaposlenih.

## Viri

1. Bernstein, J. A., Alexis, N., Bacchus, H., Bernstein, I. L., Fritz, P., Horner, E., et al., 2008. The health effects of non-industrial indoor air pollution. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(3), pp. 585-591.
2. Bonetta, S., Mosso, S., Sampo, S. & Carraro, E., 2010. Assessment of microbiological indoor air quality in an Italian office building equipped with an HVAC system. *Environmental Monitoring and Assessment* 161(1-4), pp. 473-483.
3. Diggle, S., Whiteley, M. (2020). "Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat ". *Microbiology*. 166, 30-33.
4. Florian, M-L., 1997. *Heritage Eaters: Insects and Fungi in Heritage Collections*. London: James and James, pp. 1-12.
5. Hojs, A., Petrovič, A. in Furlan, N., 2002. Preprečevanje legioneloz v javnih objektih. *Zdravstveno varstvo*, 41, pp. 299-304.
6. Kordbachen, P., Zaini, F., Kamali, P., Ansari, K., Safara, M. (2005). Study on the sources of nosocomial fungal infections at intensive care unit and transplant wards at a teaching hospital in Tehran. *Iranian Journal of Public Health*, 34: 1-8.
7. Méheust, D., Cann, P., Reboux, G., Millon, L., Gangneux, J. P., 2014. Indoor fungal contamination: Health risks and measurement methods in hospitals, homes and work places. *Crit Rev Microbiol*, 40(3), pp. 248-260.
8. Ministrstvo za zdravje, 2008. *Prostorska tehnična smernica TSG-12640-001: 2008, zdravstveni objekti*. Ljubljana: Ministrstvo za zdravje.

9. Muiioz, P., Budlo, A., Bouza, E., 2001. Environmental surveillance and other control measures in the prevention of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 7, (2); pp. 38-45.
10. SPOBO – Služba za preprečevanje in obvladovanje bolnišničnih okužb, 2013. Navodila in ukrepi pri izvajanju gradbenih del.
11. Pasquarella, C., Saccani, E., Sansebastiano, G. E., Ugolotti, M., Pasquariello, G., Albertini, R., 2012. Proposal for a biological environmental monitoring approach to be used in libraries and archives. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 19(2), pp. 209-212.
12. Samet, J.M. & Spengler, J.D., 2003. Indoor environments and health: moving into the 21st century. *Am J Public Health* 93(9), pp. 1489-1493.
13. Sehulster, L.M., Chinn, R.Y.W., Arduino, M.J., Carpenter, J., Donlan, R., Ashford, D., Besser, R., Fields, B., McNeil, M.M., Whitney, C., Wong, S., Juraneck, D., Cleveland, J., 2004. Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations from CDC and the Health care Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Chicago IL; American Society for Healthcare Engineering/American Hospital Association.
14. Soroka, P.M., Cyprowski, M., Szadkowska-Stańczyk, I., 2008. Occupational exposure to mycotoxins in various branches of industry. *Med Pr* 59,(4), pp. 333-345.



## Sladkorna bolezen in zdravljenje z glukokortikoidi

*Nadan Gregorič*

*Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Univerzitetni klinični center Ljubljana*

*nadan.gregoric@kclj.si*

### Uvod

Uporaba glukokortikoidov je v sodobni klinični praksi zelo razširjena. Zaradi močnega protivnetnega učinka, so osnovna terapija pri zdravljenju številnih avtoimunskih in kroničnih vnetih bolezni. Predstavljajo pomemben del imunosupresornega zdravljenja pri presaditvi organov, onkologiji ter osnovno zdravljenje težjih oblik COVID-19. Kljub ugodnim terapevtskim učinkom so neželeni učinki glukokortikoidov številni in težavni. Hiperglikemija je med najbolj pogostimi in škodljivimi neželenimi učinki, ki poveča tveganje za obolevnost in umrljivost. Zdravljenje je zato ključnega pomena, ki pa se pomembno razlikuje od drugih oblik zdravljenja sladkorne bolezni.

### S steroidi povzročena sladkorna bolezen

Glukokortikoidi povzročijo motnje presnove glukoze na večih nivojih. Zmanjšajo izločanja inzulina, zmanjšajo občutljivost na inzulin v tarčnih tkivih in povečajo proizvodnjo glukoze oz. glukoneogenezo. Zaviralni učinek na izločanje inzulina je takojšnji, po nekaj urah se nato zmanjša še občutljivost tkiv na inzulin in traja tudi več ur oziroma dni. Končni učinek na glikemijo je odvisen tudi od velikosti odmerka in moči glukokortikoida. Tabela 1 prikazuje ključne značilnosti glukokortikoidov. Učinek glukokortikoidov je pričakovano največji ob sistemskem jemanju, torej parenteralno ali peroralno. V nasprotju s splošnim prepričanjem k nastanku sladkorne bolezni pomembno prispevajo tudi topikalni in inhalacijski načini vnosa glukokortikoidov.

Vrsta glukokortikoida	Ekvivalentni odmerek (mg)	Čas delovanja (ure)	Vpliv na glikemijo (ure)		
			Začetek	Vrh	Konec
<b>Hidrokortizon</b>	25	8-12	1	3	6
<b>Metilprednizolon</b>	5	12-36	4	8	12-16
<b>Deksametazon</b>	1	36-72	8	različno	24-36

Tabela 1: prikaz ekvivalentnih odmerkov glukokortikoidov, njihov čas delovanja in čas vpliva na glikemijo.

Tveganje za nastanek hiperglikemije oz. sladkorne bolezni je večje pri osebah, ki imajo že prisotno motnjo v presnovi glukoze ali genetsko nagnjenost. Tako je verjetno večja pri starostnikih, pri debelih, pri osebah z mejno bazalno glikemijo ali moteno toleranco za glukozo in pri tistih, ki imajo sladkorno bolezen tipa 2 prisotno v družini. Na podlagi kliničnih raziskav lahko pričakujemo, da se bo sladkorna bolezen razvila pri približno tretjini bolnikov zdravljenih z glukokortikoidi, v bolnišničnem okolju, kjer se pogosteje predpisuje večje odmerke glukokortikoidov, pa je delež precej večji, do 70 %. S steroidi povzročena bolezen je praviloma reverzibilna motnja. Če hiperglikemija vztraja po ukinitvi glukokortikoidnega zdravljenja, pomeni, da je bila verjetno že predhodno prisotna sladkorna bolezen tipa 2.

Hiperglikemija ima škodljive učinke na zdravje. V bolnišničnem okolju je hiperglikemija povezana z daljšo hospitalizacijo, večjo verjetnostjo za okužbe in zaplete ter večjo umrljivostjo. Pri onkoloških bolnikih in pri bolnikih po presaditvi organa, ki so razvili steroidno sladkorno bolezen, so beležili večje število zapletov in večjo umrljivost.

### Klinične značilnosti

Hiperglikemija se običajno pojavi že po zaužitju prvega obroka, nato po vsakem naslednjem obroku postopno narašča in do konca dneva doseže najvišjo vrednost. Tekom noči učinek glukokortikoida popušča in se praviloma povsem normalizira.

Zaradi hiperglikemije po obrokih je oralni glukozni tolerančni test (OGTT) bolj uporabna metoda za preseganje kot zgolj določanje glukoze zjutraj na tešče, ko je lahko pogosto normalna. V hospitalnem okolju je uporabnost in izvedba OGTT omejena, zato se svetuje določanje glukoze trikrat dnevno pred obroki in naključno. Diagnostični kriteriji za postavitve diagnoze veljajo povsem enaki kot za ostale oblike sladkorne bolezni: glikemija 7,0 mmol/L ali več na tešče in/ali 11,1 mmol/L ali več 2 uri po obroku ali naključno, kar je treba potrditi s ponovno meritvijo na drug

dan. Uporabnost metode določanja glikiranega hemoglobina (HbA1c) je ob samem začetku zdravljenja zelo omejena, saj je negativna napovedna vrednost slaba. Povsem drugače je ob povišanih vrednostih, saj vrednost 6,5 % ali več, ob potrditvenem testu, že zadostuje diagnozi sladkorne bolezni. Povišana vrednost HbA1c ob samem začetku zdravljenja z glukokortikoidi nam pove, da je bila sladkorna bolezen zelo verjetno prisotna že prej in lahko pričakujemo pomembno porast glikemije, ki bo zahtevala tudi trajno antihiperglikemično zdravljenje.

### Antihiperglikemično zdravljenje

Hospitalizirane bolnike pričnemo zdraviti, ko glikemija pred obrokom večkrat preseže 7,8 mmol/L oz. po obroku 11,0 mmol/L. Za peroralno zdravljenje se odločamo pri relativno blagi hiperglikemiji, do 15 mmol/L, pri bolnikih, ki so v stabilnem kliničnem stanju in se predvidljivo prehranjujejo.

Če peroralna terapija ne zadostuje oz. pri pogosto visokih vrednostih glikemije in pri akutno prizadetih bolnikih (npr. v intenzivni enoti), pride v poštev subkutano inzulinsko zdravljenje.

Ker pričakujemo največji porast glikemije po zajtrku, nekoliko manjši pred kosilom in najmanjši pred večerjo, temu primerno odmerjamo tudi antihiperglikemično terapijo tako, da jutranjemu odmerku običajno namenimo 50 % celodnevnega odmerka, opoldanskemu 30-40 % in večernemu le 10-20 %. Večerni odmerek pogosto ni potreben. Zaradi občasne zapoznele absorpcije glukokortikoida pride do največjega porasta glikemije šele po kosilu. Začetni odmerek antihiperglikemika določimo na podlagi izhodiščnih vrednosti glikemije, nato ga postopno povečujemo, da dosežemo stabilno glikemijo.

Pri peroralnih antihiperglikemikih dajemo prednost inzulinskim sekretagogom, predvsem repaglinidu, katerega učinek je hiter in kratkotrajen ter tako primeren za pokrivanje obrokov. Je tudi varna izbira pri ledvični okvari. Med sulfonilsečninami se najpogosteje uporablja glikvidon, ki ima podobne farmakološke lastnosti kot repaglinid. Pri preostalih peroralnih antihiperglikemikih je veliko manj kliničnih izkušenj. Zaradi relativne varnosti in učinkovitosti zdravila iz skupine inkretinov predstavljajo dobro alternativo. Pri bolnikih z znano sladkorno boleznijo, se praviloma povečajo odmerki že obstoječe terapije oz. uvede dodaten antihiperglikemik ali inzulin.

Inzulinsko zdravljenje temelji na pokrivanju obrokov s kratko delujočimi inzulinskimi analogi. Podobno kot pri peroralnih antihiperglikemikih, se začetni odmerek postopno titrira do ustreznega učinka. Odmerjanje je individualno, saj nekateri bolniki potrebujejo zelo visoke odmerke, drugim pa zadostuje manj kot 10 enot inzulina na obrok. Pri določanju velikosti odmerka upoštevamo vrednost glikemije pred obrokom in predvideno potrebo inzulina za določen obrok.

Pri tem se opiramo na predhodne odmerke iz preteklih dni. Odmerke prilagajamo postopno, tako da povečujemo oz. zmanjšujemo odmerek za 10-20 % na dan. Pri sladkorni bolezni tipa 1 običajno povečamo vse odmerke inzulina, predvsem prandialne. Če se glikemija tekom noči ne normalizira oz. je na tešče povišana, je potrebna še uvedba bazalnega inzulina pred spanjem.

V hospitalnem okolju je ciljna glikemija med 7,8 in 10,0 mmol/L, oz. med 6,1 in 7,8 mmol/L pri tistih z nizkim tveganjem za hipoglikemijo. Pri ambulantno vodenih bolnikih, je cilj zdravljenja individualiziran glede na bolnikovo starost, pridružene bolezni in kognitivne zmožnosti. Za večino bolnikov so to vrednosti med 5,0 in 7,0 mmol/L pred obroki in do 10,0 mmol/L 2 uri po obroku in vrednost glikiranega hemoglobina (HbA1c) enako ali manj kot 7,0%.

Zdravljenje z glukokortikoidi je dinamičen proces. Odmerki se lahko precej spreminjajo (zmanjševanje odmerkov v fazi umirjanja bolezni oziroma povečevanja odmerkov v fazi poslabšanja), zato je potrebno antihyperglikemike pogosto prilagajati, kar predstavlja velik izziv za bolnika, kot za zdravnika. Edukacija bolnika je zato ključnega pomena. Načeloma velja, da se spremembi odmerkov glukokortikoidov v enakem razmerju prilagodi tudi antihyperglikemično terapijo (npr. pri 50 % znižanju odmerka glukokortikoida se za 50 % zmanjša odmerek antihyperglikemika). Pri cikličnem odmerjanju glukokortikoidov (npr. premedikacija pri kemoterapiji) se za krajši čas dvigne odmerek obstoječe antihyperglikemične terapije.

## Zaključek

Sladkorna bolezen je pomemben in pogost zaplet zdravljenja z glukokortikoidi, ki je povezan s povečano obolevnostjo in umrljivostjo. Zato je ključnega pomena čimprejšnja diagnoza in zdravljenje.

## Viri

1. Gulliford MC, Charlton J, Latinovic R. Risk of diabetes associated with prescribed glucocorticoids in a large population. *Diabetes Care*. 2006;29(12):2728–29.
2. Fong AC, Cheung NW. The high incidence of steroid-induced hyperglycaemia in hospital. *Diabetes Res Clin Pract*. 2013;99(3):277–80.
3. Liu XX, Zhu XM, Miao Q, Ye HY, Zhang ZY, Li YM. Hyperglycemia induced by glucocorticoids in nondiabetic patients: A meta-analysis. *Ann Nutr Metab*. 2014;65(4):324–32.
4. Umpierrez GE, Hellman R, Korytkowski MT, Kosiborod M, Maynard GA, Montori VM, et al. Management of hyperglycemia in hospitalized patients in non-critical care setting: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(1):16–38.

## Zdravljenje z inzulinom

*Miodrag Janić*

*Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana*

*miodrag.janic@kclj.si*

### Uvod

Sladkorno bolezen pričnemo zdraviti z vnosom eksogenega inzulina, kadar ima oseba delno ali popolno pomanjkanje izločanja lastnega (endogenega) inzulina. Namen je vzdrževati normalne oz. sprejemljive koncentracije glukoze v krvi, s čimer preprečujemo simptomatiko hiperglikemije, akutne zaplete sladkorne bolezni ter dolgoročno tudi kronične zaplete. Zdravljenje z inzulinom je nujno potrebno pri vseh osebah s sladkorno boleznijo tipa 1 od odkritja sladkorne bolezni dalje, pri ostalih populacijah oseb s sladkorno boleznijo, se odločamo individualno glede na različne dejavnike.

Zdravljenje z inzulinom mora biti prilagojeno tako, da večino časa zagotavlja normalne koncentracije glukoze v krvi, tako podnevi kot ponoči in je ob tem čim bolj varno, torej z majhnim tveganjem za hipoglikemijo. Najbolj optimalno bi bilo, da bi eksogeni inzulini posnemali delovanje endogenega inzulina.

### Biologija in vrste inzulinov

Inzulin je beljakovina, zato ga je treba aplicirati v podkožje (subkutano), saj bi se ob zaužitju preko ustne votline (per os) v prebavilih razgradil. Le izjemoma je potrebno inzulin pri akutnih stanjih, diabetični ketoacidozi, hiperglikemičnem hiperosmolarnem sindromu ali izjemno visokih koncentracijah glukoze v krvi (npr. zdravljenje v enoti intenzivne terapije) aplicirati intravensko (v kontinuirani infuziji).

### *Inzulini glede na molekularno strukturo*

Glede na molekularno strukturo ločimo humane inzuline in njihove analoge. Humani inzulin je enak molekuli človeškega inzulina, molekula inzulinskega analoga pa je pridobljena s pomočjo

rekombinantne tehnologije in modificirana tako, da ima bolj ugodne farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti.

#### *Inzulini glede na trajanje učinkovanja*

Po trajanju učinkovanja razdelimo inzuline na ultrakratkodelujoče in kratkodelujoče analoge, ki delujejo 3–4 ure, kratkodelujoči humani inzulin, ki deluje do 6 ur, srednjedogodelujoči humani inzulin, ki deluje do 18 ur, dolgodelujoče inzulinske analoge, ki delujejo do 24 ur, ter ultradogodelujoče inzulinske analoge, ki delujejo do 42 ur. Dodatno so na voljo tudi predpripravljene fiksne mešanice humanih inzulinov ali analogov (dvofazni insulini), ki vsebujejo določen fikсни delež kratkodelujočega inzulina (kar je v imenu preprata označeno s številko), preostanek pa predstavlja srednjedogodelujoči inzulin.

#### *Inzulini glede na naslavljanje potreb*

Pri zdravih se ves čas, tudi v času stradanja, izloča majhna količina inzulina, ki zavira glukoneogenezo v jetrih in predstavlja t.i. bazalno izločanje. Ob zaužitju hrane pa se iz celic trebušne slinavke izločijo večje količine inzulina, t.i. prandialno izločanje, ki zagotovijo uskladičenje glukoze, ki se sprosti v krvni obtok po zaužitju obroka. Opisane fiziološke vzorce izločanja inzulina poskušamo oponašati z aplikacijami in kombiniranjem eksogenega inzulina. Tako uporabljamo srednjedogodelujoče, dolgodelujoče in ultradogodelujoče inzuline za nadomeščanje bazalnih potreb, imenujemo jih tudi bazalni insulini. Za nadomeščanje prandialnih potreb pa uporabljamo ultrakratkodelujoče in kratkodelujoče inzuline.

V tabeli 1 so zbrani v Sloveniji trenutno dostopni humani insulini in analogi. Poznavanje imen je smiselno zaradi lažjega razumevanja shem zdravljenja in prilagajanja odmerkov v vsakodnevni klinični praksi.

**Tabela 1.** V Sloveniji dostopni inzulini glede na trajanje učinkovanja ter naslavljanje potreb. NPH – neutral protamine hagedorn; NPL – neutral protamine lispro; PA – protamine aspart; GLP-1 – glukagonu podoben peptid-1.

Opis	Preparat	Komercialno ime	Začetek delovanja (min)	Vrh delovanja (h)	Trajanje delovanja (h)
<b>PRANDIALNI INZULINI</b>					
Ultrakratkodelujoči analogi	aspart	Fiasp	15–20	1,5–2	5–7
	lispro-aabc	Lyumjev	15–17	1	4,5–7
Kratkodelujoči analogi	glulisin	Apidra	15–30	1–3	2–4
	lispro	Humalog	15–30	1–3	2–4
	aspart	Novorapid	10–30	0,5–3	3–5
Kratkodelujoči humani	regular	Actrapid, Humulin R	30–60	2,5–5	4–12
<b>BAZALNI INZULINI</b>					
Srednjedolgodelujoči humani (NPH)	NPH	Humulin N, Insulatard	60–120	4–8	< 18
Dolgodelujoči analogi	glargin	Lantus, Abasaglar	60–240	brez	22–24
	detemir	Levemir	60–240	brez	12–20
Ultradolgodelujoči analogi	glargin U300	Toujeo	60–360	brez	24–36
	degludek	Tresiba	60–540	brez; stabilno stanje 2–3 dni	> 42

<b>DVOFAZNI INZULINI</b>					
Humani	30 % regular, 70 % NPH	Humulin M3, Mixtard 30	30–60	2–12	18–24
Analogi	25 % lispro, 75 % NPL	Humalog Mix (25)	10–30	1–6	14–24
	50 % lispro, 50 % NPL	Humalog Mix (50)	10–30	1–14	14–24
	30 % aspart, 70 % PA	NovoMix (30)	10–20	1–4	18–24
	50 % aspart, 50 % PA	NovoMix (50)	10–20	1–4	14–24
<b>INZULIN V FIKSNI KOMBINACIJI Z AGONISTOM GLP-1</b>					
Ultradolgodelujoči + agonist receptorjev GLP-1	degludek + liraglutid	Xultophy	/	/	/
Ultradolgodelujoči + agonist receptorjev GLP-1	glargin + lixisenatide	Suliqua	/	/	/

### Inzulinske sheme

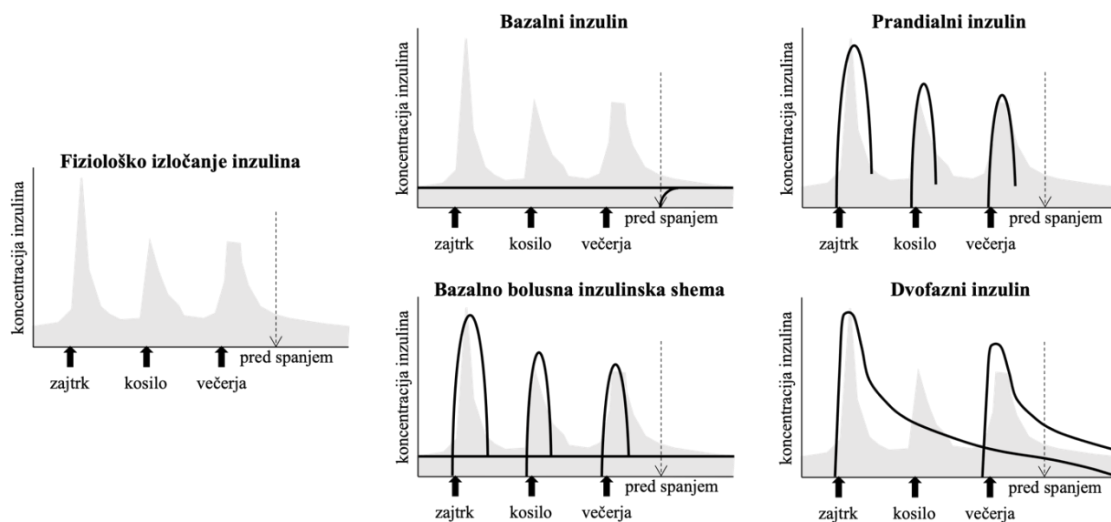
Inzulini so na voljo v standardni koncentraciji 100 E/ml. Nekateri inzulini pa so pripravljene v večjih koncentracijah, 200 E/ml ali 300 E/ml, tako da lahko z manjšim volumnom apliciramo enako število enot (lispro U200, degludek U200, glargin U300).

Za zdravljenje lahko uporabljamo samo eno vrsto insulina, lahko pa jih med seboj kombiniramo. Običajno kombiniramo inzuline različnega trajanja delovanja. Čas začetka in doseg vrha delovanja posameznih insulinov je zapisan v tabeli 1. Pozorni smo, da na pravočasno aplikacijo opozorimo osebo s sladkorno boleznijo, saj je običajno potrebno humani kratkodelujoči inzulin injicirati 30–45 min pred obrokom, analog kratkodelujočega insulina pa le 10–15 minut pred obrokom oziroma tudi neposredno pred obrokom, če uporabljamo analog ultrakratkodelujočega insulina. Način, ki najbolj posnema fiziološko izločanje insulina, imenujemo bazalno-bolusno inzulinsko zdravljenje



oz. intenzivirano zdravljenje. Pri tem načinu si oseba s sladkorno boleznijo bazalni insulin aplicira enkrat ali dvakrat dnevno, prandialni inzulin pa pred glavnimi obroki (običajno trikrat dnevno), kar je prikazano na sliki 1, ki prikazuje tudi druge oblike inzulinskega zdravljenja in njihov učinek v primerjavi s fiziološkim izločanjem glukoze. Zdravljenje z insulinom kombiniramo tudi s peroralnimi antidiabetiki.

Odmerki insulina so prilagojeni posamezniku in se med osebami s sladkorno boleznijo lahko močno razlikujejo. V povprečju je celokupni dnevni odmerek insulina 0,6–0,8 E insulina na kilogram telesne teže. Pri debelih, ki imajo pomembno povečano odpornost na inzulin, so odmerki insulina lahko tudi pomembno (2 do 3-krat) večji. Od celokupnega dnevnega odmerka insulina 40–50 % predstavljajo odmerki bazalnega insulina, 50–60 % pa odmerki prandialnega insulina. Odmerek prandialnega insulina običajno razdelimo na 50 % pred zajtrkom, 30 % pred kosilom in 20 % pred večerjo. Pri sladkorni bolezni tipa 1 lahko osebe nadomeščajo inzulin tudi s pomočjo inzulinske črpalke.



**Slika 1.** Prikaz fiziološkega izločanja insulina in različnih inzulinskih shem oziroma kombiniranja različnih inzulinov.

## Hipoglikemija

Najpogostejši neželeni učinek zdravljenja z inzulinom je hipoglikemija, ki je posledica več vzrokov. O hipoglikemiji moramo osebe s sladkorno boleznijo ustrezno educirati ter naučiti, kako ob njej ukrepati in jo preprečevati.

### **Namesto zaključka**

Oseba s sladkorno boleznijo, ki je zdravljena z inzulinom, potrebuje strukturirano edukacijo, ki zajema edukacijo o uporabi medicinskih pripomočkov, merjenju koncentracije glukoze v krvi oz. uporabi senzorskega sistema za določanje koncentracije glukoze v podkožju, vedeti mora zakaj ima postavljene določene ciljne vrednosti in kakšne le-te so, kako si aplicirati inzulin, kako titrirati odmerke, osnove o hipoglikemiji, prehrani, varnost vožnje in hitrih spremembah glikemije.

### **Viri**

1. Lunder M. Zdravljenje sladkorne bolezni z insulinom. In: Poljanec Bohnec M, Peklaj K, ur. Sladkorna bolezen: priročnik za zdravstvene delavce. Del 2, Zdravljenje sladkorne bolezni z zdravili ter preprečevanje akutnih in kroničnih zapletov. Ljubljana: društvo EDMED; 2022. p. 70–77.
2. Pongrac Barlovič D, ed. Slovenske smernice za klinično obravnavo sladkorne bolezni tipa 2. Ljubljana: Diabetološko združenje Slovenije; 2022.
3. Mathieu C, Martens PJ, Vangoitsenhoven R. One hundred years of insulin therapy. *Nat Rev Endocrinol.* 2021;17:715–725.
4. Lajara R, Cengiz E, Tanenberg RJ. The role of the new basal insulin analogs in addressing unmet clinical needs in people with type 1 and type 2 diabetes. *Curr Med Res Opin.* 2017;33(6):1045–55.
5. Misra S, Mathieu C. Are newer insulin analogues better for people with Type 1 diabetes? *Diabet Med.* 2020;37(4):522–31.

## Samovodenje – prilagajanje odmerkov insulina

*Milena Poljanec Bohnc*

*Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Univerzitetni klinični center Ljubljana*

*milena.bohnc@kclj.si*

### Uvod

Samovodenje je del oskrbe osebe s sladkorno boleznijo in pomeni, da ukrepa na podlagi samokontrole, samostojnega merjenja koncentracije glukoze. Ukrepa lahko na različne načine, med katerimi se lahko samostojno odloča ter glede na svojo zmožnost za ustrezno odločanje. To so lahko npr. ustrezno prilagajanje odmerkov antihiperglikemičnih zdravil (tablet ali/in insulina) na podlagi rednih meritev glukoze, zaužite količine in vrste hrane, načrtovanje telesne dejavnosti.

Kadar so meritve, ki jih izvaja posameznik, del načrta zdravljenja in je posameznik hkrati opremljen z veščinami v sklopu strukturiranega izobraževanja, namenjenega spremembam vedenja, lahko privedejo do doseganja ciljnih vrednosti glukoze in preprečevanja hipoglikemij. (1). V nadaljevanju je kot primer opisano prilagajanje odmerkov nekaterih vrst insulina.

Mnogi posamezniki, ki živijo s sladkorno boleznijo, težko dosegajo zastavljene cilje za obvladovanje sladkorne bolezni. Dolgotrajna uporaba zdravil in sprememba življenjskega sloga sta potrebni za uspešno obvladovanje tako sladkorne bolezni tipa 1 kot sladkorne bolezni tipa 2 (2).

### Samovodenje in zdravljenje z insulinom

Insulinsko shemo v zdravljenju prilagodimo posamezniku. Poznamo več vrst insulinskih pripravkov z različno hitrim začetkom delovanja in različno dolgim časom delovanja. Za pokrivanje potreb po insulinu po obrokih hrane uporabljamo t. i. kratkodelujoči (ultrakratkodelujoči, bolusni) insulin, za nadomeščanje osnovnih dnevnih potreb telesa po insulinu pa dolgodelujoči (srednjedolgodelujoči, bazalni) insulin.

Bolusni insulin se običajno vbrizga tik pred obrokom. Ko zaužijemo obrok, ki vsebuje živila z ogljikovimi hidrati (npr. kruh, krompir, kosmiči, sadje itd.), se raven glukoze dvigne, saj se hrana z ogljikovimi hidrati spremeni v glukozo. Insulin je kot ključ in odklene celična vrata, da omogoči glukozni iz krvnega obtoka vstop v telesne celice, da ustvari energijo.

Bazalni insulin je insulin, ki ga telo potrebuje ves čas – podnevi in ponoči – tudi med obroki (5).

Uporabljamo tudi zdravila, kjer sta kombinirana insulina z različnima začetkoma in dolžino učinkovanja oziroma je insulin kombiniran z zdravilom iz drugih farmakoloških razredov. Ta prispevek ne vsebuje primerov samovodenja s temi načini zdravljenja.

### **Merjenje koncentracije glukoze ob insulinskem zdravljenju**

Ves čas zdravljenja z insulinom je treba meriti koncentracijo glukoze takrat, kadar je to potrebno zaradi varnosti zdravljenja in doseganja glikemičnih ciljev. Meritve se lahko izvajajo npr. pred vsemi glavnimi obroki in pred spanjem.

Še natančnejši vpogled dajejo meritve po obrokih hrane (od 90 do 120 minut po začetku obroka) ter izjemoma ponoči med drugo in tretjo uro. Priporočamo še dodatne meritve glukoze pri vseh spremembah počutja in v posebnih okoliščinah (1).

### **Uvedba insulinskega zdravljenja**

Zdravljenje navadno začnemo z izhodiščnimi odmerki insulina, ki jih nato postopoma prilagajamo glede na izmerjene vrednosti glukoze (začetno prilagajanje). Ko določimo posameznikove izhodiščne odmerke, je v nadaljevanju zdravljenja potrebno sprotno prilagajanje odmerkov (samovodenje), pri katerem upoštevamo več dejavnikov:

- *zaužito količino in vrsto hrane,*
- *načrtovano telesno dejavnost,*
- *izmerjeno vrednost glukoze v krvi,*
- *morebitne posebne okoliščine (3, 4).*

## Začetno prilagajanje odmerkov insulina ob uvedbi zdravljenja

### Pravilo postopnosti

Pravilo postopnosti pomeni, da odmerek insulina prilagodimo, če zaporedoma pridobimo več neustreznih meritev glukoze ob koncu časa delovanja posameznega insulina.

- Če je vrednost glukoze previsoka, odmerek insulina zvečamo.
- Če je prenizka, pa odmerek insulina zmanjšamo (3, 4).

Prilagoditve odmerkov izvajamo v manjših korakih (na primer za 1–2 enoti vsak drugi ali tretji dan).

### Načelo odmerjanja dolgodelujočega insulina

Bazalni (dolgodelujoči) odmerek insulina prilagajamo pred prilagajanjem drugih bolusnih (kratkodelujočih) odmerkih insulina. Bazalni insulin mora ohraniti glukozo stabilno čez noč in med obroki. Običajno ga vbrizgavamo enkrat dnevno, v nekaterih primerih tudi dvakrat dnevno. Hkrati je treba vbrizgavati insulin vsak dan (ali v rednih 12-urnih intervalih, če se daje dvakrat dnevno). Meritev glukoze pred spanjem je potrebno izvesti vsaj 2 do 4 ure po jedi in vbrizgu kratkodelujočega insulina pred večerjo (5).

#### Primer odmerjanja pred spanjem

Odmerek dolgodelujočega (bazalnega) insulina pred spanjem bo vplival na izmerjeno vrednost glukoze naslednje jutro na tešče. Na vrednost glukoze zjutraj na tešče torej vplivamo s spreminjanjem odmerka dolgodelujočega insulina pred spanjem.

- Če je vrednost glukoze zjutraj na tešče več dni zaporedoma previsoka, odmerek dolgodelujočega insulina pred spanjem zvečamo.
- Če je vrednost glukoze zjutraj na tešče več dni zaporedoma prenizka, odmerek dolgodelujočega insulina pred spanjem zmanjšamo (3, 4, 5).

Opozorilo: V zgodnjih jutranjih urah (med drugo in četrto uro) je vrednost glukoze tudi pri zdravih osebah navadno najnižja. Večanje odmerka dolgodelujočega insulina pred spanjem, ki vpliva na vrednost glukoze ponoči in na tešče, lahko ob presežku povzroči nočno hipoglikemijo, ki bolnika

prebudi. Včasih človek nočne hipoglikemije ne zazna in jo prespi, raven glukoze pa se zaradi delovanja insulinu nasprotujočih hormonov do jutra lahko celo zviša. V obeh primerih je odmerek dolgodelujočega insulina pred spanjem treba zmanjšati (3, 4, 5).

V primeru, da je glukoza med drugo in tretjo uro zjutraj, ter na tešče več dni zapored previsoka je treba zvečati bazalni insulin pred spanjem (5).

Bazalni inzulin je idealno titriran, ko so meritve ali odčitki glukoze stabilni, zlasti čez noč in do jutra (gre za privzem glukoze, ki jo proizvajajo jetra, ne glukoze, pridobljene iz hrane) (6).

### ***Načelo odmerjanja kratkodelujočega insulina***

Kratkodelujoči insulin vbrizgamo pred obrokom (v idealnem primeru 5 do 15 minut pred obrokom), da zmanjšamo porast glukoze po obroku (pričakovani porast je približno za 3 mmol/l). Če je glukoza znotraj zastavljenega cilja 3 do 4 ure po začetku zaužitja obroka, je odmerek insulina pred tem obrokom ustrezen. Štetje ogljikovih hidratov lahko izboljša natančnost bolusnih odmerkov insulina (5).

### **Primer odmerjanja insulina pred zajtrkom**

Odmerek insulina pred zajtrkom bo vplival na izmerjeno vrednost glukoze pred kosilom. Na vrednost glukoze pred kosilom torej vplivamo s spreminjanjem odmerka insulina pred zajtrkom. Upoštevati je treba tudi morebitne malice.

- Če je vrednost glukoze pred kosilom več dni zaporedoma previsoka, odmerek insulina pred zajtrkom zvečamo.
- Če je vrednost glukoze pred kosilom več dni zaporedoma prenizka, odmerek insulina pred zajtrkom zmanjšamo (3, 4, 5).

Enako načelo velja tudi za preostale odmerke kratkodelujočega insulina pred vsemi obroki.

Začetno prilagajanje odmerkov insulina poteka več dni zaporedoma. Še zlasti v tem času je treba redno spremljati glukozo v krvi. Tako posameznik pridobiva dragocene lastne izkušnje in se uči samovodenja.

Pravilo postopnosti ne velja v posebnih okoliščinah, na primer med prebolevanjem akutne bolezni (gripa, angina, črevesne in druge okužbe), med zdravljenjem v bolnišnici, pri težjih stanjih itd. V

takih okoliščinah se vrednost glukoze lahko izraziteje in hitreje spreminja, zato je potrebno tudi hitrejše in sprotno prilagajanje odmerkov insulina (3, 4, 5).

### Sprotno prilagajanje odmerkov insulina

Potem ko določimo posameznikove izhodiščne odmerke insulina, je v nadaljevanju zdravljenja potrebno sprotno prilagajanje odmerkov (samovodenje). Pri tem ne velja pravilo postopnosti. Spremembe odmerkov insulina so lahko izrazitejše in različne od dneva do dneva. Predvsem to velja za odmerjanje kratkodelujočega insulina.

Osnovno načelo naprednega prilagajanja odmerkov kratkodelujočega insulina izhaja iz vsakokratne ocene vrste in količine zaužite hrane (predvsem količine ogljikovih hidratov) in predvidene telesne dejavnosti, ki bo morda sledila vbrizgavanju insulina. Če je vrednost glukoze v krvi pred obrokom previsoka, to prav tako upoštevamo pri odmerjanju kratkodelujočega insulina in dodamo nekaj enot za popravek (t. i. korekcijo).

$$\text{ODMEREK} = \text{HRANA} + \text{KOREKCIJA} - \text{GIBANJE}$$

Izhodiščni odmerek dolgodelujočega insulina spreminjamo redkeje. Takrat upoštevamo predvsem trajanje in intenzivnost načrtovane ali nedavno zaključene telesne dejavnosti ter morebitne posebne okoliščine (npr. prebolevanje akutne bolezni).

### Viri

1. Volčanšek, Š., Zaletel, J. *Načini spremljanja glikemije in glikemični cilji*. V: Slovenske smernice za klinično obravnavo sladkorne bolezni tipa 2. Ljubljana: Združenje endokrinologov Slovenije, 2022.
2. Gonzalez, J. S., Tanenbaum, M. L., Persis, V. Commissariat. Psychosocial Factors in Medication Adherence and Diabetes Self-Management: Implications for Research and Practice. Published in final edited form as: *Am Psychol* okt. 2016; 71 (7): 539–51. doi: 10.1037/a0040388. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5792162/> (28. 9. 2022).

3. The Royal Childrens Hospital Melbourne. *Adjusting insulin*. Dostopno na: [https://www.rch.org.au/diabetes/type-1-diabetes-toolkit/Adjusting\\_insulin/](https://www.rch.org.au/diabetes/type-1-diabetes-toolkit/Adjusting_insulin/) (28. 9. 2022).
4. The principles of insulin adjustment guidance. Dostopno na: <https://ihub.scot/media/2027/nhs-tayside-basic-insulin-adjustment-guidelines-v10.pdf> (28. 9. 2022).
5. Gloucestershire Hospitals. Department Diabetes. (2022). How to adjust your insulin dose with basal bolus regime. Dostopno na: [https://www.gloshospitals.nhs.uk/media/documents/How\\_to\\_adjust\\_your\\_insulin\\_dose\\_with\\_basal\\_bolus\\_regime\\_GHPI1290\\_01\\_22.pdf](https://www.gloshospitals.nhs.uk/media/documents/How_to_adjust_your_insulin_dose_with_basal_bolus_regime_GHPI1290_01_22.pdf) (20. 1.2023).
6. Diabetes Educators Calgary. Insulin Adjustments. Dostopno na: <https://www.diabeteseducatorscalgary.ca/medications/insulin/insulin-adjustments.html#table> (20. 1. 2023).



Predstavitve dnevne bolnišnice oddelka za hematologijo in onkologijo Splošne bolnišnice Celje.

*Damijan Slakan*

*Oddelek za hematologijo in onkologijo, Splošna bolnišnica Celje*

*s.damjan@hotmail.com*

V sklopu Državnega programa obvladovanja raka je bil izdelan načrt decentralizacije sistemskega zdravljenja onkoloških bolnikov, ki predvideva ureditev dejavnosti tudi v določenih regijskih bolnišnicah. Z vzpostavitvijo enote, ki smo jo poimenovali Dnevna bolnišnica, smo maja 2013 v Splošni bolnišnici Celje začeli med drugim z izvajanjem sistemskega in podpornega zdravljenja bolnikov z rakom dojk in rakom debelega črevesa in danke.

16. januarja 2023 je bila otvoritev etape 1 nadomestne novogradnje Splošne bolnišnice Celje, v katerem je tudi dnevna bolnišnica.

Prednost enodnevne obravnave je skrajšan čas bivanja v bolnišnici saj bolnik odide domov, praviloma še isti dan.

Enota obsega trakt P;

- hematološka ambulanta, onkološka ambulanta, čakalnica, odvzem krvi,
- čakalnica za dnevno bolnišnico,
- soba za posege, v kateri se izvajajo diagnostično terapevtski posegi (punkcije in biopsije kostnega mozga) (v letu 2022 je bilo opravljenih preko 100 tovrstnih posegov pri hematoloških bolnikih), v sosednjem prostoru je prostor za opazovanje po posegu.
- ambulanta, ki je namenjena pregledu bolnikov pred aplikacijo terapije in pogovoru glede predvidenega začetnega oz. nadaljevalnega zdravljenja,
- prostor za aplikacijo terapije:
  - v osrednjem prostoru sta dve postelji za aplikacijo dolgotrajnih terapij in osem (eden v sobi za izolacije) počivalnikov za kratkotrajne aplikacije, prav tako je v tem prostoru tudi reanimacijski voz,

- vsak prostor ima monitor za spremljanje življenjskih funkcij katerega lahko nadziramo tudi centralno
  - centralni pult, skozi katerega imamo nadzor nad celotno dnevno bolnišnico,
  - v izolacijski sobi se nahaja en počivalnik, prostor pa je posebej urejen za bolnike, ki imajo večkratno odporne bakterije,
- od funkcionalnih prostorov ima dnevna bolnišnica sobo za pripravo terapij, kjer poteka priprava premedikacij, sprejem sistemske terapije iz lekarne in krvnih pripravkov iz transfuzijskega centra, prostor za hladilno omaro, arhiv za stekelca sternalnih punkcij, dnevni prostor za osebje, sanitarne prostore za osebje in bolnike, čakalnico in shrambe.

V dnevni bolnišnici se:

- izvaja sistemsko zdravljenje za področje onkologije, hematologije, gastroenterologije, revmatologije, dermatologije in urologije (hormonska terapija), pri čimer uporabljamo 39 citostatikov in bioloških zdravil,
- aplikacija vseh krvnih pripravkov, železovih preparatov,
- aplikacija bisfosfonatov in rastnih faktorjev.

Optimalno oskrbo hematoloških in onkoloških bolnikov ter ostalih bolnikov zagotavlja tesno sodelovanje multidisciplinarnega tima.

Osnovni tim v dnevni bolnišnici sestavljajo zdravnik (internist, usmerjen v onkologijo in hematologijo), diplomirani medicinski sestri in farmacevt.

Celoten tim je odgovoren za strokovno in varno aplikacijo terapij in razumljivo zdravstveno vzgojno delo. Vsi zaposleni se vključujejo tudi v delo na oddelku. Tako zdravniki kot medicinske sestre v dnevni bolnišnici so poleg rutinskega dela vključeni v pedagoško delo, načrtovanje nemotenega poteka dela, pripravo standardov in ustrezne dokumentacije ter koordinacijo med različnimi izvajalci.

Diplomirane medicinske sestre opravljajo izobraževanje (delavnice) s področja oskrbovanja podkožnih venskih valvul ter izobraževanja apliciranja krvnih derivatov za zaposlene medicinske sestre v Splošni bolnišnici Celje.

S področja oskrbovanja podkožnih venskih valvul so bile izvedene 4 delavnice v letu 2022, prav tako 4 delavnice s področja hipodermoklize. V letu 2023 sta bili z obeh področij narejene po dve delavnici.

Ustreznega in strokovno varnega dela si ne moremo predstavljati brez farmacevtov in farmacevtskih tehnikov, ki so odgovorni za nadzor nad našimi naročili in predpisanimi shemami, izdelavo pripravkov in strokovno podporo pri izobraževanju. Priprava sistemske terapije v celoti poteka v lekarni. Zaradi kompleksnega zdravljenja onkoloških bolnikov, polifarmakoterapij, možnih interakcij in stranskih učinkov je sodelovanje s farmacevti nujna oblika sodelovanja.

Ker naš računalniški program Cato za naročanje sistemske terapije še ni zaživel, imajo tako medicinske sestre v dnevni bolnišnici kot tudi farmacevti izjemno veliko dela. Sestre morajo prebrati vsak ambulantni zapisnik bolnika in naročilo vnesti v matriko, ki jo v natisnjeni obliki pošljejo v lekarno.

V lekarni farmacevti te podatke vnesejo v računalniški sistem. Klinična pot od naročila sistemske terapije do izvedbe je naslednja:

1. zdravnik v ambulanti določi shemo zdravljenja in odmerke zdravil,
2. v dnevno bolnišnico javi vse potrebne podatke in predviden termin aplikacije sistemske terapije,
3. medicinska sestra v dnevni bolnišnici podatke za lekarniško naročilo vnese v matriko in bolnika vpiše v plansko knjigo, kjer določi tudi čas predvidene aplikacije glede na organizacijske možnosti,
4. transportna ekipa naročilo odnese v lekarno, kjer ga računalniško obdelajo farmacevti in pristopijo k izdelavi pripravka,
5. ko pride bolnik v dnevno bolnišnico, ga najprej pregleda in se še enkrat z njim pogovori zdravnik, ter ga napoti v sobo za aplikacijo terapije,
6. tukaj se bolnik seznanja z osebjem, ki opravi zdravstveno vzgojo in aplicira predpisano premedikacijo,
7. ko farmacevti pripravijo zdravilo, ga transportna ekipa v posebnih prenosnih torbah dostavi v sobo za pripravo terapije,
8. po preverjanju bolnikovih podatkov, izmerjenih vitalnih funkcijah in identifikaciji bolnika se prične postopek aplikacije sistemske terapije,
9. zaključek sistemske terapije se izvede z meritvijo vitalnih funkcij, potrebnim časom opazovanja pri določenih terapijah, napotki za premagovanje stranskih učinkov, navodili za režim zdravljenja doma, navodili za kontrolni pregled ali aplikacijo potrebnih rastnih faktorjev doma,

10. po odhodu bolnika se prične postopek naročila in načrtovanje za naslednji cikel terapije.

Podatke o predpisanih odmerkih zdravil glede na izbrano shemo ob vsakem krogu preveri tudi farmacevt, zaradi kontrole in morebitnih prilagoditev odmerkov. V prihodnosti si tako medicinske sestre, kot farmacevti želimo elektronski list sistemske terapije, s čimer bi še dodatno zmanjšali tveganje človeške napake in hkrati učinkovitejše izrabili čas.

Pripravili smo protokole zdravljenja s posameznimi shemami sistemskega zdravljenja, s katerimi smo želeli na enem mestu združiti vse bistvene podatke o posamezni shemi zdravljenja.

Pred odprtjem dnevne bolnišnice, so ti bolniki ležali na oddelku, ter zasedali prostor drugim bolnikom. Pred otvoritvijo smo ustrezno izobrazili kader, pripravili ustrezne prostore in dorekli na novo določeno logistiko.

Protokoli so osnovani na povzetkih glavnih značilnosti zdravil (SmPC), navodilih za posamezno shemo terciarnih centrov in drugi strokovni literaturi. Protokoli pri nas ne nadomeščajo temperaturnega lista.

Zdravnik predpisani protokol terapije in krog zdravljenja napiše na temperaturni list. Naša zdravstveno-negovalna dokumentacija pa ima izdelan list aplicirane terapije. Vsak list aplicirane terapije vsebuje identifikacijske podatke bolnika, razpredelnico z vpisanimi zdravili (premedikacija, podpora terapija, citostatiki), prostor za vitalne funkcije in neželene učinke ter prostor za podpis odgovorne osebe.

V naši dnevni bolnišnici izvajamo v največji meri adjuvantno sistemsko zdravljenje, nekaj neoadjuvantnega in paliativno oskrbo. Način aplikacije je najpogosteje intravenozni, ki mu sledi subkutani. Trajanje aplikacij je lahko od nekaj minut do nekaj ur. Časovno in prostorsko največ časa namenimo aplikacijam krvnih pripravkov, sledijo citostatske sheme in tarčna zdravila.

Povprečno obravnavamo 20 bolnikov dnevno. Sedanje prostorske kapacitete so zasedene med 90- in 100-%. V letu 2022 je bilo izvedenih preko 5.000 obravnav. Velikokrat je potrebno dnevno prilagajanje dejavnosti glede na različne potrebe.

V dnevni bolnišnici zagotavljamo:

- sodelovanje tima protibolečinske ambulante – analgezija,
- sodelovanje dietetika – prehranska podpora, ocena prehranskega statusa,
- individualen posvet s farmacevtom glede strokovnega mnenja o uporabi alternativnih zdravil,

- psihosocialno oskrbo – strokovno podporo, terapevtski pogovor in svetovanje v težki življenjski situaciji.

Vsak bolnik na sistemskem zdravljenju pred prvo aplikacijo terapije dobi pisna in ustna navodila glede nadaljnjih ukrepov v domačem okolju. Navodila se osredotočajo na jemanje zdravil, neželene učinke zdravljenja ter ukrepe za zmanjšanje le-teh. Zajemajo tudi priporočila glede telesne aktivnosti, razvad in prehrane med zdravljenjem, pisna navodila glede ustne higiene ter priporočila, kdaj je potrebno poiskati zdravniško pomoč ter ustrezne kontaktne številke.

## Zdravstvena nega odraslega bolnika, ki prejema blinatumomab

*Sara Kos*

*Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana*

*sara.kos@kclj.si,*

### **Zdravljenje z blinatumomabom**

Zdravilo blinatumomab Blincyto® je biološko zdravilo, ki omogoča imunskemu sistemu, da napade in uniči nenormalne rakave bele krvne celice.

Blinatumomab je indiciran kot monoterapija za zdravljenje:

- Odraslih bolnikov s CD19-pozitivno recidivno ali refraktarno akutno limfoblastno levkemijo (ALL – acute lymphoblastic leukaemia) predhodniških celic B. Bolniki z ALL predhodniških celic B s pozitivnim Philadelphia kromosomom morajo imeti neuspešno zdravljenje z vsaj 2 zaviralcema tirozin kinaze (TKI – tyrosin kinase inhibitor) in nimajo nobenih alternativnih možnosti zdravljenja.
- Odraslih bolnikov s CD19-pozitivno ALL predhodniških celic B z negativnim Philadelphia kromosomom pri prvi ali drugi popolni remisiji z vrednostjo minimalne rezidualne bolezni (MRD – minimal residual disease), ki je večja ali enaka 0,1 %.
- Pediatričnih bolnikov, starih 1 leto ali več, s CD19-pozitivno ALL predhodniških celic B z negativnim Philadelphia kromosomom, ki je refraktarna ali recidivna po vsaj dveh predhodnih zdravljenjih oziroma recidivna po opravljeni predhodni alogenski presaditvi hematopoetskih matičnih celic.
- Pediatričnih bolnikov, starih 1 leto ali več, s prvim recidivom CD19-pozitivne ALL predhodniških celic B z negativnim Philadelphia kromosomom z visokim tveganjem, in sicer kot del konsolidacijskega zdravljenja.

Različne raziskave na področju zdravljenja z blinatumomabom ugotavljajo bistveno daljše splošno preživetje, v primerjavi z drugimi vrstami kemoterapij pri odraslih bolnikih z relapsom in refraktornim ALL prehodniškim B-celicam.

### Zdravljenje z zdravilom blinatumomab:

Za začetek zdravljenja z blinatumomabom je priporočljiva hospitalizacija bolnika in zdravljenje pod nadzorom zdravnika. Bolniki, ki tehtajo 45kg ali več, prejmejo fiksni odmerek. Trajanje bolnišničnega zdravljenja je odvisno od vrste malignoma in ciklusa zdravljenja. V prvem ciklusu lahko po 9 dneh bolnišničnega zdravljenja, nadaljujemo zdravljenje v domači oskrbi, v drugem ciklusu pa po 2 dneh. Zdravljenja odraslih na domu v Sloveniji zaenkrat še ne izvajamo, v tujini pa je ta oblika že vpeljana.

### Stranski učinki terapije

Pri zdravljenju z zdravilom blinatumomab so opazili naslednje stranske učinke:

- nevrološki učinki, ki so lahko privedli tudi do smrtnih izidov. Nevrološki učinki so vključevali encefalopatijo, konvulzije, motnje govora, motnje zavesti, zmedenost in dezorientiranost ter motnje koordinacije in ravnotežja. Starejši bolniki so bolj dovzetni za resne nevrološke učinke. Bolniki z anamnezo nevroloških znakov in simptomov so imeli večji delež nevroloških učinkov (kot so tremor, omotica, stanje zmedenosti, encefalopatija in ataksija) med zdravljenjem. Večina nevroloških učinkov je klinično reverzibilnih in po ukinitvi zdravljenja izzvenijo.
- Sindrom sproščanja citokinov (CRS) je eden izmed smrtno nevarnih stranskih učinkov. Simptomi, ki spremljajo CRS so povišana telesna temperatura, glavobol, slabost, hipotenzija, povišani jetrni encimi in bilirubin ter prisotnost diseminirane intravaskularne koagulacije (DIK).
- Približno 25% bolnikov, ki je prejemale blinatumomab v kliničnem preizkušanju, so imeli resne okužbe, kot so sepsa, pljučnica, kateterska okužba, med katerimi so bile nekatere smrtno nevarne ali so se končale s smrtnim izidom.
- Sindrom tumorske lize (TLS).
- Nevtropenija in febrilna nevtropenija.
- Povišani jetrni encimi.
- Pri bolnikih, ki so prejemale Blincyto v kombinaciji z deksamethasonom so poročali o smrtnem pankreatitisu.

- Levkoencefalopatija: Čeprav klinični pomen ni znan, so pri bolnikih, ki so prejeli zdravilo blinatumomab, opazili spremembe magnetne resonance lobanje (MRI), ki kažejo na levkoencefalopatijo, zlasti pri bolnikih, ki so se predhodno zdravili z obsevanjem lobanje in antilevkemično kemoterapijo.

### Zdravstvena nega bolnika, ki prejema blinatumomab

Blinatumomab se aplicira 28 dni, 24 ur na dan z neprekinjenim intravenskim infundiranjem preko infuzijske črpalke. Črpalka mora omogočati prilagajanje programa, ne sme biti elastomerna in mora imeti alarm. Ker teče zdravilo kontinuirano je pomembno, da se ob menjavi infuzijskega sistema, sistem odzrača z zdravilom. V ta namen je v infuzijski vsebnik dodan pribitek zdravila za polnjenje infuzijskega sistema. Medicinska sestra mora poskrbeti, da bolnik prejme pravilen odmerek. Aplikacija mora potekati preko sterilnega, apirogenega linijskega filtra z velikostjo por 0,2 $\mu$ m, ki minimalno veže proteine. Pri pacientih, ki so tekom aplikacije hospitalizirani, medicinska sestra po naročilu zdravnika pacientu aplicira zdravilo kontinuirano, vedno v isti lumen. Zdravila se ne odklaplja, samega lumna pa ne prebrizgava. Večkrat dnevno je potrebno venski pristop preveriti in se prepričati, da aplikacija poteka pravilno in brez težav. Medicinska sestra vsakodnevno izvaja monitoring pacienta, ki zajema merjenje vitalnih funkcij, odvzem venske krvi za laboratorijske preiskave ter spremljanje nevrološkega statusa, s postavljanjem istih vprašanj. V primeru prisotne nevtropenije po naročilu zdravnika aplicira profilaktično terapijo antibiotikov. Poleg postopka aplikacije je naloga medicinske sestre tudi, da bolnika pouči o pravilni aplikaciji terapije in hitremu ukrepanju ob alarmu črpalke, o stranskih učinkih terapije ter ukrepah ob pojavu teh. Bolnik dobi vodnik za bolnike in skrbnike, navodilo za uporabo ter kartico za bolnika.

### Viri

1. Blincyto. Amgen; 2022 [cited 2023 Mar 19]. Available from: <https://www.blincytohcp.com/rr>.
2. Kantarijan H, Stein A, Gokbuget N, Fielding A K, Schuh A C, Ribera J M, et al. Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia. The New England journal of medicine. 2017; 376:836-47.
3. Martinelli G, Boissel N, Chevallier P, Ottmann O, Gokbuget N, Rambaldi A, et al. Long-term follow-up of blinatumomab in patients with relapsed/refractory Philadelphia chromosome-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Final analysis of ALCANTARA study. European journal of cancer. 2021;146:107-114.
4. Vodnik za medicinske sestre: Pomembne informacije o zmanjševanju tveganj.



## Zdravstvena nega otroka, ki prejema blinatumomab – predstavitev primerov

*Mojca Toplišek*

*Klinični oddelek za otroško hematologijo in onkologijo, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana*

*mojc.toplisek@gmail.com*

Zdravilo so razvili v nemško-ameriškem podjetju Micromet leta 2012. Decembra 2014 je bilo zdravilo odobreno za uporabo v ZDA. Blinatumomab je vrsta imuno terapije, ki se veže na protein imenovan CD 19, ki ga v večini najdemo na limfocitih B. Zdravljenje z blinatumomabom v današnjem času prihaja vedno bolj v ospredje, saj so rezultati zelo spodbudni.

### **Terapevtske indikacije**

Zdravljenje z blinatumomabom je indicirano kot monoterapija za zdravljenje bolnikov od prvega leta dalje s CD 19 pozitivno akutno limfoblastno levkemijo (ALL).

### **Odmerjanje in način uporabe**

Zdravljenje se mora začeti pod vodstvom in nadzorom izkušenega zdravstvenega tima, ki izvaja stalni nadzor bolnika.

Pred pričetkom aplikacije blinatumomaba je potrebno bolnika premedicirati. Priporočena je uporaba antipiretika redno med celotnim ciklusom.

### **Zapleti**

- Nevrološki učinki
- Okužbe
- Sindrom sproščanja citokinov (citokinski vihar)
- Sindrom lize
- Nevtropenija in febrilna nevtropenija
- Pankreatitis

## Predstavitev primerov

Na našem oddelku smo do sedaj zdravili 4 bolnike z blinatumomabom. Dva bolnika smo zdravili z blinatumomabom zaradi kombinacije relapsa, ter rezistentne levkemije, druga dva zaradi toksičnih učinkov kemoterapije.

### Primer 1

Tedaj 5 letni deček je bil diagnosticiran za ALL. Zdravljen je bil s klasično kemoterapijo in po dveh letih redno zaključil z vzdrževalnim zdravljenjem.

Dve leti po končanem zdravljenju je pri dečku prišlo do relapsa bolezni. Prišel je z zdravljenjem s klasično kemoterapijo, a je po zaključku prvega bloka terapije prišlo do resnih zapletov:

- PRESS sindrom
- konvulzije
- hepatopatija

Nadaljeval je s klasično kemoterapijo, sicer delno prilagojeno a so vsakemu bloku sledili zapleti (sepsa, mukozitis, akutni pankreatitis,...). Kljub zapletom smo s klasično kemoterapijo dosegli zadovoljivo remisijo. Nadaljeval je z vzdrževalnim zdravljenjem, a je žal prišlo do ponovnega relapsa bolezni, kar je indiciralo zdravljenje z blinatumomabom.

Deček je prejel 1. ciklus blinatumomaba. Zaradi zgodovine zapletov je bila dečku uvedena profilaktična antiepileptična terapija. Prvi dan postane visoko febrilen, z mrzlico. Laboratorijski izvidi pokažejo na citokinski vihar, tretji dan apliciran – tocilizumab- Roactemra® (antiinterlevkin). S tem smo zavrli prekomerni vnetni odziv. Naslednji dan deček postane afebrilen, vnetni parametri so v upadanju. S ciklusom smo nadaljevali, saj prekinitev ni trajala dolgo. Preostali del cikla je potekal brez zapletov po protokolu. Po končanem ciklu je bila pri dečku opravljena transplantacija krvotvornih matičnih celic (KMC).

Sama transplantacija je potekala kot pričakovano, potreboval je dodatek kisika, + 25 dan je prišlo do dihalne stiske, dečka smo premestili v intenzivno enoto, kjer je prišlo do zagona GVHD, ki je bil poleg redne podpore zdravljen z mezenhimskimi celicami.

Po več odmerkih mezenhimskih celic, ter terapijo z ekstra korporalno fotoferezo (ECP) je deček odšel na rehabilitacijo v Sočo.

Deček je vso prejeto terapijo blinatumomaba prejel v bolnišnici.

Danes deček obiskuje zavod za usposabljanje invalidne mladine Kamnik.

## Primer 2

Takrat 8 letni deček je bil diagnosticiran za B - ALL. Po končanem prvem zdravljenju s klasično kemoterapijo je po dveh letih zaključil z vzdrževalnim zdravljenjem. Po letu dni je prišlo do relapsa bolezni. Takrat 11 letni deček je pričel s kemoterapijo.

Zaradi toksičnih učinkov kemoterapije:

- sepsa
- okužba zgornjih dihal
- osteomielitis
- celulitis
- obsežna Pseudomonas aeruginosa okužba presakralno
- absces sakruma
- rezistentna ALL,

smo se odločili za zdravljenje z blinatumomabom. Med prvo aplikacijo je pri dečku prišlo do blage hipotenzije in nekajkrat povišane telesne temperature z mrzlico. Prejel je dva bloka Blinatumomaba. Pri drugem bloku ni imel posebnih težav. Ob preveritvi kostnega mozga je bil ugotovljen relaps bolezni, zato smo nadaljevali s kemoterapijo s katero smo dosegli remisijo. Indicirana je bila transplantacija KMC. Manj kot leto dni po opravljeni alogeni transplantaciji KMC je prišlo ponovno do relapsa bolezni. Pri dečku smo nato opravili zdravljenje s chimeric antigen receptorjem (CAR-T) terapijo v tujini. Nekaj dni po aplikaciji CAR-T je prišlo do citokinske nevihte, prejel je tocilizumab (antidot).

Žal pa je prišlo do ponovnega relapsa bolezni, zato je deček pričel z zdravljenjem z inotuzumab ozogamicinom, s čimer smo dosegli remisijo in nato opravili transplantacijo KMC sorodnega dajalca (oče). Deček je vso terapijo blinatumomaba prejel v bolnišnici. Danes 16 letni deček obiskuje 1. letnik gimnazije in se počuti odlično.

## Primer 3

Deklica se je zdravila za ALL, že v začetku zdravljenja je spadala v rizično skupino in je bila zdravljena po protokolu za HR. Zaradi dolgotrajnih zavor po vsakem bloku (sepse, zavora delovanja kostnega mozga, febrilne nevtropenije,...) nismo uspeli redno nadaljevati zdravljenja, prav tako so bili zapleti vedno intenzivnejši.

Pričela je zdravljenje z blinatumomabom, ki ga je izpeljala brez večjih zapletov. Prvi cikel blinatumomaba je prejela v večini med bolnišničnim zdravljenjem, med katerim smo vsakodnevno spremljali njen klinični status, vzporedno pa smo pridobili vso tehnično podporo (črpalko za zdravljenje na domu, priučili mamo rokovanja z infuzijsko črpalko, ter kako ukrepati ob morebitnih zapletih). Ob prejemu črpalke in infuzijskih sistemov je 48 ur prejela terapijo v bolnišnici. Zapletov ni bilo, zato je deklica odšla domov in zadnji teden ciklusa terapijo prejela v domačem okolju. Drugi cikel zdravljenja z blinatumomabom je pričela v bolnišnici, kjer smo po protokolu spremljali njeno zdravstveno stanje. Ker težav ni imela, je od drugega tedna ciklusa prejela zdravilo doma. Redno je prihajala na oddelek, kjer je bila menjana vrečka z zdravilom, opravljena kontrola krvnih izvidov, ter kliničnega statusa. Danes je v remisiji in uživa med domačimi.

#### Primer 4

Takrat 7 letni deček je prišel v našo ambulanto zaradi bolečin v sklepih. Diagnosticirana mu je bila ALL pre B. Prišel je z zdravljenjem s kemoterapijo. Po aplikaciji pegilirane asparaginaze-Oncospara© so se pojavili rahli glavoboli, opravljen je bil nevrološki test na latentno parezo spodnjih okončin, ki pokaže pozitiven izvid. Posnetek EEG je imel normalen. Po aplikaciji tethotreksata intratekalno se od doma vrne zaradi febrilne nevtropenije, uvedemo antibiotično terapijo. Tretji dan hospitalizacije opazimo povešen D ustni kot, ter monoplegijo D roke. MR preiskava pokaže citokinski edem in toksično leukoencefalopatijo, prišlo je do okvare možgan. Ob podporni terapiji se je nekaj dni dečkovo stanje še vedno slabšalo, nato pa postopno izboljšalo.

Nadaljevali smo s prirejeno klasično kemoterapijo. Zaradi nevrotoksičnosti po aplikaciji Metotreksata smo blok M, ko bolniki prejema metotreksat zamenjali z dvema blokoma blinatumomaba. Prvi dan aplikacije deček postane febrilen, ob tem so vnetni parametri nizki. Pojavi se glavobol, asimetrija v koordinaciji gibov L in D roke zato je uvedena antiedematозна terapija (deksametazon). Stanje se počasi izboljša, opazimo občasen tremor ene ali druge roke. Mati se je priučila rokovanja s črpalko za domačo uporabo. Deveti dan smo dečka odpustili v domačo oskrbo. Prihajal je na vsakodnevno menjavo vrečk z zdravilom, ob tem smo dnevno spremljali njegov klinični status. Zdravljenje na domu je potekalo brez večjih zapletov, v primeru kakršnekoli spremembe ali nejasnosti pa smo bili mami vedno dosegljivi za telefonski posvet, tako medicinske sestre, kakor tudi zdravniki.

Ob blintumomabu je prejemal tudi intratekalno terapijo (Ara-C in prednisolon)

Po 14 dnevem premoru je prejel še drugi blok blinatumomaba, pri tem je postal prvi dan febrilen, ponovno se je pojavil tremor rok, zato je bil uveden deksametazon. Deček je bil 5 dni

hospitaliziran, nato smo ga odpustili v domačo oskrbo, kjer je nadaljeval z zdravljenjem. Sprva je hodil vsak dan, nato pa na 48 ur na menjavo vrečke z zdravilom, ter kontrolo kliničnega statusa in krvnih izvidov. Nadaljeval je zdravljenje po protokolu II. – kemoterapija. Med tem je prebolel tudi okužbo s COVID-19. Danes deček še prejema vzdrževalno terapijo. Počuti se dobro, nevroloških znakov nima.

## Viri

1. Pogovor z dr. Tomaž Prelog
2. Zdravstvena dokumentacija ISPEK
3. <https://www.ema.europa.eu> › product-information
4. <https://www.cancer.gov> › news-events

# PRIPRAVA, SHRANJEVANJE IN IZDAJA KRVNIH KOMPONENT (SMSZT)

Pomen dobrega sodelovanja med Zavodom za transfuzijsko medicino in Kliničnim oddelkom za hematologijo na nivoju zdravstvene nege

Ana Marija Kovačič Tonejc

Oddelek za preskrbo s krvjo, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana

Anamarijakovacic-tonejc@ztm.si

## Uvod

Transfuzijska medicina kot stroka zagotavlja z upoštevanjem zakonskih predpisov, pravilnikov, standardno operativnih postopkov, sistema kakovosti in strokovnih smernic ustrezno in varno zdravljenje s transfuzijo krvi.

Varna in zadostna preskrba s krvjo je odvisna od pridobivanja in vzdrževanja zadostnega števila prostovoljnih krvodajalcev, ki imajo majhno tveganje okuženosti z virusi in drugimi povzročitelji bolezni, ki se prenašajo s krvjo in so hkrati pripravljene redno darovati kri.

Osnova vseh komponent krvi je polna kri, odvzame se jo pod točno določenimi pogoji in standardi in je izhodišče za kakovost vseh komponent, ki jih iz nje pridobimo. Priprava komponent krvi zahteva postopke, ki so skrbno načrtovani in nadzorovani s strani usposobljenega zdravstvenega osebja. Lastnosti komponent krvi se spremlja v procesu končne kontrole kakovosti in morajo dosegati visoke standarde.

Shranjevanje komponent krvi zahteva stalen in neprekinjen nadzor (npr. nadzorovanje temperature) in se izvaja samo s kvalificirano in kalibrirano opremo.

Za zagotovitev varne transfuzije pri bolniku je ključnega pomena strokovno izvajanje postopkov pri naročanju komponent krvi, predtransfuzijskih postopkih ter ob transfuziji krvi.

Človeška napaka je ena glavnih vzrokov obolevnosti in smrtnosti po transfuziji krvi. Do napake lahko pride na vsaki stopnji transfuzijske verige, npr. pri jemanju bolnikove krvi, med laboratorijskim testiranjem, pri izdaji komponent krvi in med samim postopkom transfuzije.

Vsi udeleženi, ki sodelujejo pri algoritmu naročanja krvi si prizadevajo, da se prepreči neželene dogodke ob transfuziji krvi.

### **Zakaj je pomembno sodelovanje v zdravstvenem timu in kakšna je vloga medicinske sestre**

Sodelovanje med različnimi udeleženci v transfuzijski verigi je pomembno in je zagotovilo za varno in učinkovito uporabo komponente krvi. Vloga medicinske sestre je ključna in je poleg zdravnika in laboratorijskega osebja odgovorna, da bolniki prejmejo varno in ustrezno komponento krvi ter, da se postopek transfuzije izvaja po standardno operativnem postopku in ob upoštevanju strokovnih smernic.

#### **1. Pomoč pri ocenjevanju zdravstvenega stanja bolnika**

Poleg zdravnika, kateri je glavni nosilec zdravljenja, bo medicinska sestra izvedla vse postopke, ki so potrebni za pred transfuzijsko testiranje in naročanje krvi.

#### **2. Pridobitev pisnega pristanka**

Bolniku bodo posredovane vse potrebne informacije o koristih in tveganju transfuzije krvi na njemu razumljiv način. Pred transfuzijo se pridobi pisni pristanek.

#### **3. Spremljanje bolnikovega zdravstvenega stanja med transfuzijo krvi**

Med postopkom transfuzije bo medicinska sestra pozorno spremljala bolnika glede morebitnih znakov neželene reakcije, kot so zvišana telesna temperatura, mrzlica ali koprivnica. Redno spremlja bolnikove vitalne znake, po potrebi prilagodi hitrost transfuzije in ravna po navodilu zdravnika.

#### **4. Zdravstveno vzgojno delo**

Zdravstveno vzgojno delo igra pomembno vlogo pri izobraževanju bolnikov in zdravstvenega osebja o varni in učinkoviti rabi komponent krvi o postopku transfuzije, tveganjih in koristih transfuzije krvi ter kako prepoznati in obvladovati morebitne neželene dogodke ob transfuziji krvi.

## Strategije za izboljšanje sodelovanja med zdravstvenim osebjem v multidisciplinarnem timu pri transfuziji krvi

### 1. Spodbujanje odprte komunikacije

Odprta in poštena komunikacija omogoča, da je transfuzija najučinkovitejša, najvarnejša in popolnoma razumljena oblika zdravljenja.

Spodbujanje članov tima, vključno z bolnikom, da postavljajo vprašanja, izražajo pomisleke in delijo informacije, ki so potrebne za zagotovitev varne transfuzije komponent krvi je pri tem ključnega pomena.

### 2. Spodbujanje kulture sodelovanja

Ustvarjanje okolja, v katerem se vsi člani zdravstvenega tima počutijo prijetno, ko prispevajo svoje ideje in strokovno znanje. Sodelovanje pri reševanju problemov in sprejemanju odločitev pripomore k uspešnejšemu delovanju in sodelovanju tima.

### 3. Vzpostavitev jasnih komunikacijskih poti

Komunikacija je ključnega pomena pri skupnem prizadevanju za skupne cilje, to je zagotavljanje varne transfuzije krvi.

### 4. Standardizacija postopkov

Standardizacija postopkov v transfuzijski medicini pomaga zmanjšati možnost napak in zagotoviti, da zdravstveno osebje upošteva iste protokole pri postopkih dela.

### 5. Zagotavljanje izobraževanja in usposabljanja

Zagotavljanje izobraževanja in usposabljanja omogoča zdravstvenemu osebju, da imajo vsi znanje in veščine, ki jih potrebujejo za varno in učinkovito delo.

### 6. Vzpostavitev ukrepov za nadzor kakovosti

Vzpostavitev ukrepov za nadzor kakovosti pomaga zagotoviti, da se postopki transfuzije krvi izvajajo pravilno in da se napake odkrijejo pravočasno.



## Metode

Na Zavodu za transfuzijsko medicino (ZTM) smo iz informacijskega sistema Datec pridobili podatke o vseh komponentah krvi izdanih na Klinični oddelek za hematologijo od I. 2019 do I. 2022. Zanimalo nas je koliko posameznih komponent krvi je bilo izdanih in kakšen je bil trend izdaje po vrsti komponente krvi.

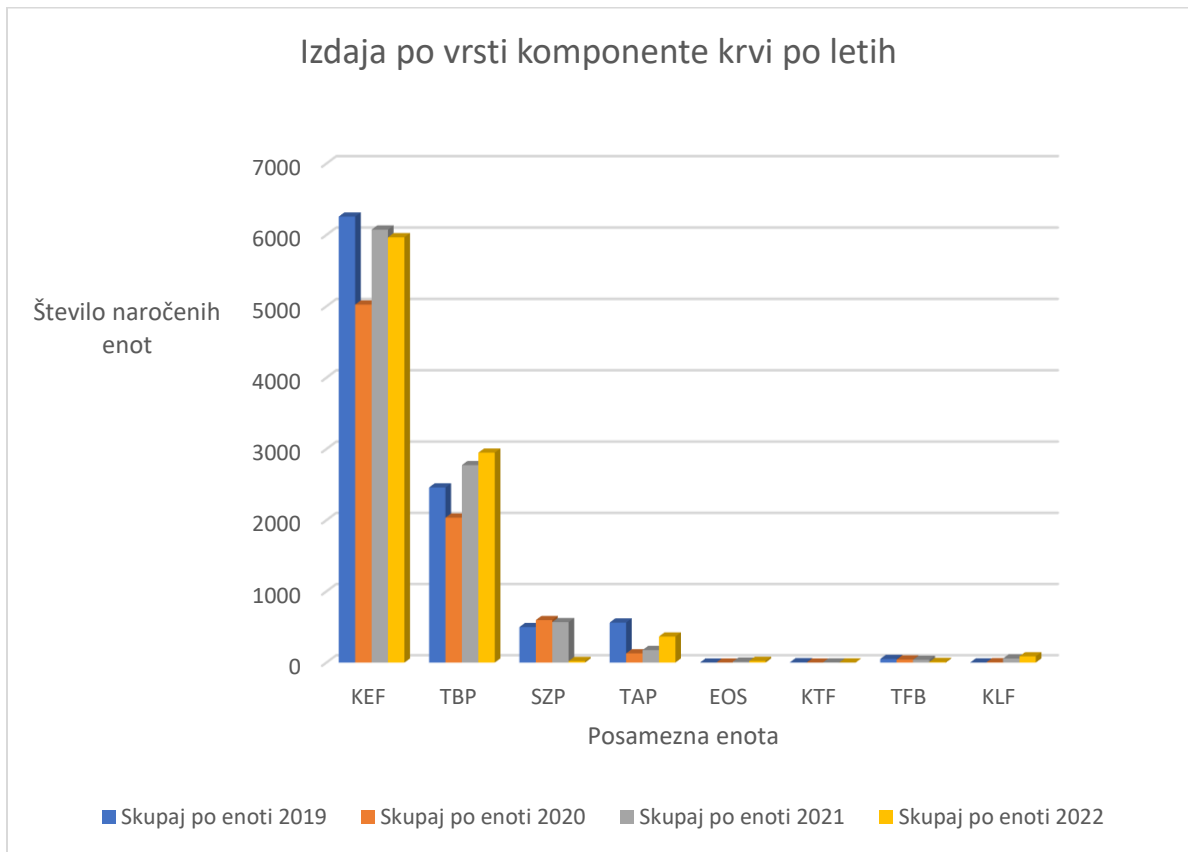
## Rezultati in razprava

Iz Tabele 1 in Slike 1 je razvidno, da se na KO za hematologijo izda največ eritrocitov. V letu 2020 je viden trend zmanjšanja naročanja in posledično izdaje komponent krvi, razen sveže zmrznjene plazme, verjetno kot posledica epidemije s Covidom in strogih ukrepov, ki so takrat veljali. Največ trombocitov pridobljenih iz polne krvi, obdelanih s psoralenom je bilo naročenih in izdanih v letu 2022, trombocitov pridobljenih s postopkom afereze in patogensko inaktiviranih pa v letu 2019. Največ sveže zmrznjene plazme je bilo izdane v letu 2020, v letu 2022 pa se beleži visok trend upadanja naročanja in izdaje sveže zmrznjene plazme.

Tabela 1: Izdaja komponent krvi na KO za hematologijo od leta 2019 do 2022

IZDAJA KOMPONENT KRVNI NA KO ZA HEMATOLOGIJO OD LETA 2019 DO 2022					
LETO / KK	2019	2020	2021	2022	SKUPAJ
KEF	6257	5024	6074	5967	23322
EOS	0	0	13	23	36
KTF	5	0	2	1	8
TAP	562	130	176	366	1234
TFB	51	43	39	9	142
TBP	2460	2036	2773	2948	10217
KLF	2	5	58	88	153
SZP	499	597	568	21	1685
SKUPAJ	9836	7835	9703	9423	36797

Legenda : KEF – Eritrociti odstranjeni levkociti v ohranitveni raztopini ; SZP - Sveža zmrznjena plazma; KTF – Trombociti afereza odstranjeni levkociti; TAP - Trombociti pridobljeni s postopkom afereze, obdelani s psoralenom ; TFB – Trombociti pridobljeni iz polne krvi, zlitje, odstranjeni levkociti levkociti; TBP – Trombociti pridobljeni iz polne krvi, zlitje, obdelani s psoralenom ; KLF – Granulociti afereza; EOS – Eritrociti, odstanjeni levkociti, oprani v ohranitveni raztopini ; KK – Komponente krvi



Slika 1: Gibanje izdaje po vrsti komponente krvi v letih od 2019 do 2022.

### Zaključek

Ključna kompetenca vseh udeleženi v zdravstvenem timu, ki sodeluje v transfuzijski verigi je gotovo večina sodelovanja in povezovanja. Ob upoštevanju zakonskih določil, sledenju krvi od vene do vene ter prijavljanju in poročanju o neželenih reakcijah se zagotovi bolniku optimalno zdravljenje s transfuzijo krvi.

Znanje, odprtost za spremembe, povezovanje, komunikacijska podpora, vlaganje v razvoj in razvijanje potencialov pri sodelujočih so predpogoj za izgradnjo zaupanja, ki je osnovni pogoj za sodelovanje.

## Viri

1. Zakon o preskrbi s krvjo (ZPKrv-1 ) (Ur.l.RS št.104/9.10.2006).
2. Pravilnik o zbiranju, pripravi, shranjevanju, razdeljevanju in prevozu krvi in krvnih komponent (Ur.l.št.9/2.2.2007).
3. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 18 th Edition. 2015, Council of Europe Publishing.
4. Rožman P, Domanović D. ABC transfuzijske medicine . Celjska Mohorjeva družba; 2015. The role of the transfusion nurse in the hospital and blood centre. Dosegljivo na: <https://www.researchgate.net> (10.3.2023).

## Priprava, shranjevanje in izdaja trombocitov

*Aleš Ladiha, Jani Lovšin*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*ales.ladiha@ztm.si, jani.lovsin@ztm.si*

### Uvod

Funkcija trombocitov/krvnih ploščic je prenos snovi, pomembnih za strjevanje krvi in prehodno mehansko krpanje poškodovanih žil. Glavna fiziološka naloga trombocitov je zaustavljanje krvavitve. Poleg vloge pri vzdrževanju hemostaze so trombociti oz. biološko aktivne snovi, ki jih vsebujejo, pomembne tudi pri imunskem odzivu in pri celjenju ran kot glavni nosilci regenerativnih procesov. Transfuzija trombocitov se uporablja za zdravljenje ali preprečevanje krvavitev zaradi trombocitopenije/trombocitopatije, maligne bolezni krvotvornih organov, odpoved kostnega mozga, masivna transfuzija, kirurški posegi, idiopatska trombocitopenija, prirojene in pridobljene motnje funkcije trombocitov pri normalnem številu trombocitov. Transfuzija trombocitov je kontraindicirana pri trombotični trombocitopenični purpuri (TTP) in s heparinom povzročeni trombocitopeniji (HIT).

### Priprava trombocitnih komponent

#### **Trombociti iz polne krvi, zlitje, odstranjeni levkociti, v ohranitveni raztopini (TFB)**

Komponento pridobimo iz petih donacij polne krvi iste krvne skupine. Iz polne krvi, s pomočjo centrifugiranja pridobimo levkocitno – trombocitne plasti (buffy coat). Z njihovim zlivanjem, centrifugiranjem in filtriranjem levkocitov pridobimo končno komponento, ki ji dodamo ohranitveno raztopino. S tem postopkom ohranimo maksimalno število trombocitov namenjenih v terapevtske namene. Komponenta je ob ustreznem shranjevanju uporabna 5 dni od datuma odvzema.

#### **Trombociti pridobljeni s postopkom afereze (KTF)**

Afereza je postopek pridobivanja ene ali več komponent krvi s strojno obdelavo (celični ločevalec), po katerem se druge komponente krvi med samim postopkom ali po njem vrnejo krvodajalcu. Postopek odvzema in ločevanja poteka sočasno, med postopkom odvzema se preostale sestavine krvi vrnejo krvodajalcu, tako da se lahko odvzame večje število trombocitov.

Prednosti postopka pridobivanja trombocitov s celičnimi ločevalci je manj neželenih učinkov vezanih na tuje antigene v primerjavi s trombociti pridobljenimi iz polne krvi. Postopek je popolnoma avtomatiziran. Komponenta je ob ustreznem shranjevanju uporabna 5 dni od datuma odvzema.

### **Patogenska inaktivacija trombocitnih komponent**

Inaktivacija patogenov je novejši pristop k zagotavljanju varne transfuzije. Patogenska inaktivacija je dodatna obdelava trombocitnih komponent katera inaktivira patogene povzročitelje bolezni (virusi, bakterije, paraziti), inaktivira levkocite, manjša pogostost alo-imunizacije ter neželene učinke transfuzije. Nadomesti iskanje cytomegalo virus (CMV) negativnih dajalcev, bakteriološko kontrolo in gama obsevanje. Po učinkovitosti in varnosti so primerljivi z ostalimi pripravki trombocitov. Postopek se izvaja s pomočjo psoralena in ultraviolečnih A (UVA) žarkov. Komponenta je ob ustreznem shranjevanju uporabna 7 dni od datuma odvzema.

### **Obsevanje trombocitnih komponent**

Obsevanje je dodatna obdelava trombocitnih komponent. Obsevajo se samo komponente trombocitov, ki niso patogensko inaktivirane. Obsevanje poteka z rentgenskimi (RTG) žarki.

### **Kriterij ustreznosti trombocitnih pripravkov**

Osnova vseh krvnih komponent je polna kri, ki jo odzamemo pod točno določenimi pogoji/standardi medicinsko primernemu krvodajalcu. Kakovost tako pridobljene polne krvi je izhodišče za kakovost vseh komponent, ki jih iz nje pridobimo. Iz polne krvi se s fizikalnim ločevanjem pridobi vrsto krvnih pripravkov/komponent, ki se nato uporabijo pri različnih kliničnih indikacijah. Lastnosti krvnih komponent se skrbno spremlja v procesu končne kontrole kakovosti, tako da so vrednosti ključnih parametrov znotraj predpisanih meja, ter čim manj varirajo. Pri koncentriranih trombocitih se določa število trombocitov, volumen, število levkocitov in bakteriološka kontrola pri naključno izbranih komponentah.

Tabela 1: Kriterij ustreznosti trombocitnih pripravkov

Parameter	Kriterij sprejemljivosti
<b>Volumen</b>	TBP: 300 – 400 ml TFB: 330 – 420 ml TAP: 265 - 310 ml KTF: 285 - 315 ml
<b>Trombociti</b>	> 200 x 10 <sup>9</sup> /enoto
<b>Levkociti</b>	< 1,0 x 10 <sup>6</sup> /enoto
<b>pH - pretečeni</b>	< 6,4
<b>Bakteriološka kontrola – pred inaktivacijo</b>	NEG

Legenda: TBP – Trombociti pridobljeni iz polne krvi, zlitje, obdelani s psoralenom; TFB – Trombociti pridobljeni iz polne krvi, zlitje, odstranjeni levkociti; TAP - Trombociti pridobljeni s postopkom afereze, obdelani s psoralenom; KTF – Trombociti pridobljeni s postopkom afereze

### Pogoji shranjevanja trombocitnih komponent

Trombocitne komponente se shranjujejo v vrečkah, ki morajo biti prepustne za pline, tako da zagotavljajo trombocitom dotok kisika in odvajanje CO<sub>2</sub>. Trombolator je namenska oprema za shranjevanje trombocitnih komponent. Shranjuje se pri temperaturi med 20°C in 24°C ob stalnem mešanju, ki zagotavlja enakomerno izmenjavo plinov. Trombolator je sestavljen iz inkubatorja, ki zagotavlja želeno temperaturo in stresalnika, ki omogoča vodoravno gibanje polic na katerih shranjujemo trombocite. Pomembno je, da ustrezno temperaturo zagotavljamo med transportom in na kliničnem oddelku.

### Naročanje, izdaja in transfundiranje trombocitnih

Trombocitne komponente se naročajo z naročilnico Naročilnica za krvne pripravke, ki mora vsebovati vse potrebne podatke o bolniku in naročeni komponenti. Naročilnica na hrbtni strani vsebuje vse potrebne podatke glede naročanja komponent. Za izdajo trombocitnih komponent navzkrižni preizkus ni potreben, potrebno je določiti krvno skupino ABO prejelnika.

Medicinska sestra na zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) pri izdaji pregleda naročilo in izda trombocitno komponento kurirju, reševalcu, drugi pooblaščen osebi ali v cevno zračno pošto. Med transportom do prejelnika je potrebno zagotavljati ustrezno

temperaturo v ustreznih transportnih torbah. Neposredno pred transfundiranjem trombocitov je potrebna identifikacija prejemnika, potrebno je primerjati podatke na naročilnici in izdajnici ter izvidu krvne skupine.

Čas transfudiranja je od 30 min do 4 ure skozi 150 mikronski filter. Transfuzijski sistem in filter je potrebno predhodno navlažiti s fiziološko raztopino, s tem se zmanjša lepljenje trombocitov na steno sistema ali filtra.

### **Neželene učinki zdravljenja s transfuzijami trombocitov**

Vse neželene učinki zdravljenja s transfuzijami trombocitov je potrebno prijaviti na obrazec: Prijava neželene reakcije ob transfuziji krvi zaradi zagotavljanja hemovigilance.

Neželene učinki so: febrilna nehemolitična transfuzijska reakcija, volumska preobremenitev, hemolitična reakcija, prenos okužb, alergične in anafilaktične reakcije, aloimunizacija, akutna poškodba pljuč v zvezi s transfuzijo (TRALI), reakcija presadka proti gostitelju po transfuziji krvi (TA-GvHD), potranfuzijska purpura, hipotenzivna reakcija...

### **Zaključek**

Ustrezna uporaba trombocitnih koncentratov je odvisna od dobrega sodelovanja med strokovnjaki v transfuzijski ustanovi in kliniki, kjer zdravijo bolnika. Vsak bolnik v Republiki Sloveniji, ki potrebuje zdravljenje s krvjo, prejme kakovostno in varno transfuzijo. To omogočajo krvodajalci, ki so osnovni pogoj za preskrbo s krvjo. Samo z varnimi in učinkovitimi postopki za pridobivanje krvodajalcev in pripravkov iz krvi bomo pripomogli h kakovostnem in uspešnem zdravljenju bolnikov. Izboljševati in izpopolnjevati je potrebno opremo za kakovostno pridobivanje pripravkov. Zaposleni v transfuzijski službi se morejo stalno strokovno izpopolnjevati, pri čemer imajo medicinske sestre in zdravstveniki zelo pomembno vlogo. Poleg izvajanja kakovostne zdravstvene nege pri krvodajalcih in promocije pomena varne transfuzije pri drugih zaposlenih v zdravstvu, morajo medicinske sestre pridobiti tudi praktične veščine in tehnična znanja.

## Viri

1. ABC transfuzijske medicine. Slovenska izdaja. Celjska Mohorjeva družba, 2015.
2. Guide to the preparation, use and quality assurance of BLOOD COMPONENTS. EDQM 20<sup>th</sup> Edition 2020.
3. Standardni operativni postopek. Priprava TAP in TBP z aparatom za fotoinaktivacijo INTERCEPT SOP-P.P-34. Oddelek za preskrbo s krvjo, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino Ljubljana. Ljubljana, 2023.
4. Standardni operativni postopek. Trombociti pridobljeni iz polne krvi, zlitje, odstranjeni levkociti – z aparatom TACSI. SOP-P.P-42. Oddelek za preskrbo s krvjo, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino Ljubljana. Ljubljana, 2021.



## Obsevanje krvnih pripravkov

*Dražen Franič*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*drazen.franic@ztm.si*

### Uvod

S transfuzijo povezana reakcija presadka proti gostitelju (angl. Transfusion associated graft versus host disease, TA-GvHD) je redek, vendar življenje ogrožujoč zaplet po transfuziji krvnih pripravkov. TA-GvHD je v klinični praksi neozdravljiva bolezen z visoko stopnjo umrljivosti. Večinoma se pojavi pri bolnikih z imunsko pomanjkljivostjo, le izjemoma pri bolnikih z dobrim imunskim sistemom.

Najbolj učinkovit način za inaktiviranje limfocitov T v krvnem pripravku je obsevanje z ionizirajočimi žarki. Z obsevanjem celicam z jedrom denaturiramo DNA in jim tako preprečimo delitveno sposobnost ter s tem proliferacijo limfocitov T.

Na Zavodu za transfuzijsko medicino od leta 2007 izvajamo obsevanje krvnih pripravkov za vse bolnike v Sloveniji. V ta namen smo do začetka leta 2020 uporabljali obsevalnik Gammacell 1000 Elite, ki je imel za vir ionizirajočega radioaktivnega sevanja izotop Cs-137. Od začetka leta 2020 je v uporabi RTG obsevalnik Radgil 2, pri katerem je vir ionizirajočega sevanja RTG cev. Priporočen osrednji obsevalni odmerek je znotraj 25–50 Gy. Ciljna absorbirana doza, ki jo prejmejo krvni pripravki pri obsevanju na Zavodu za transfuzijsko medicino, je 30 Gy in je usklajena z mednarodnimi priporočili.

Obsevamo eritrocite, granulocite ter trombocite pridobljene z zlivanjem ali postopkom afereze, kadar niso patogeno inaktivirani.

### Sevanje

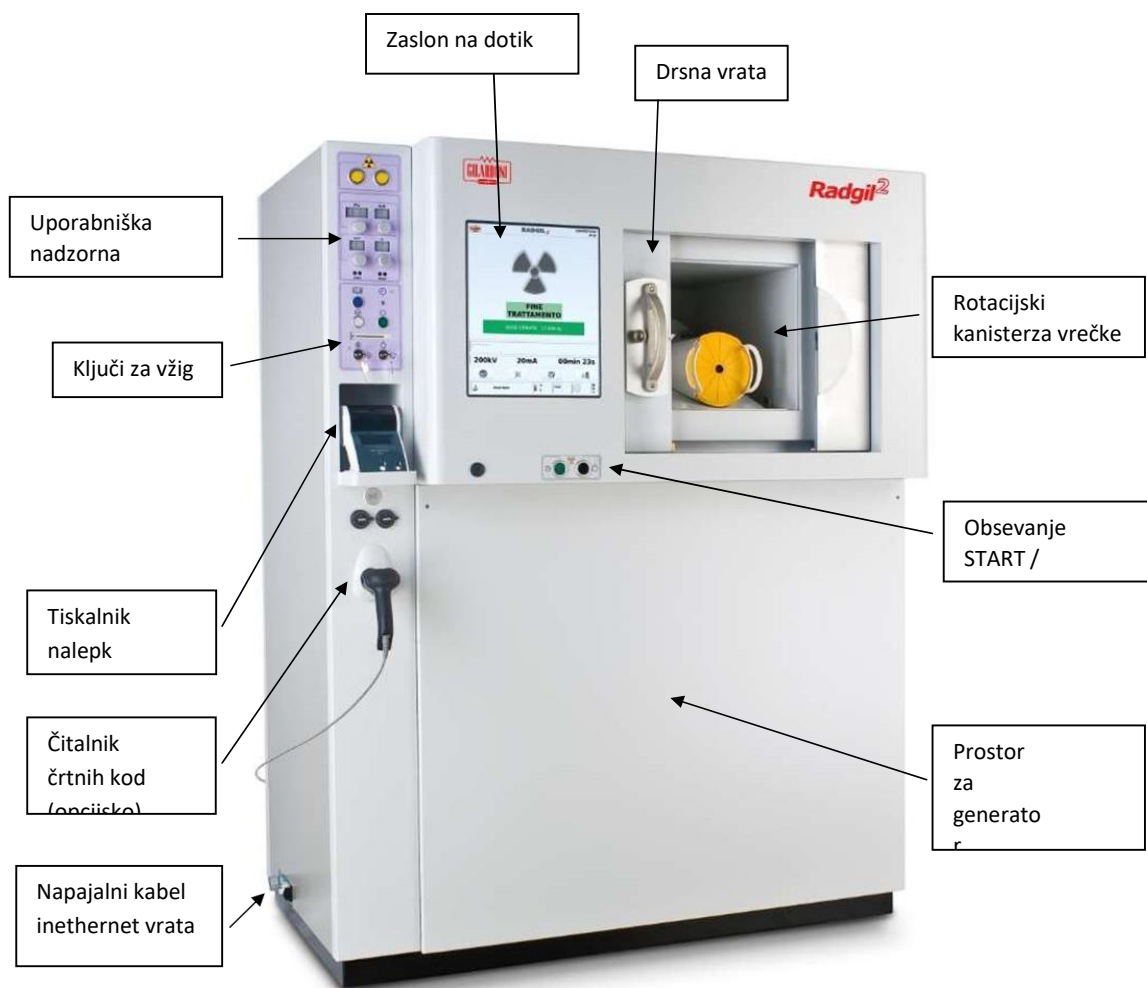
Sevanje je energija v obliki valovanja ali delcev. Razdelimo ga lahko na dve glavni vrsti: ionizirajoče in neionizirajoče sevanje. Sevanje, ki ima dovolj energije, da razbije kemijske vezi in povzroči nastanek ionov, imenujemo „ionizirajoče sevanje“. S poškodovanjem celične DNK lahko povzroči mutacije, ki lahko, če se prenašajo prek novih generacij celic, povzročijo raka ali druge škodljive učinke na zdravje. Ionizirajoče sevanje je lahko v obliki delcev, kot so alfa delci ali nevtroni, ali v obliki žarkov, kot so gama žarki ali rentgenski žarki.

RTG žarki nastanejo v rentgenski cevi, ki je vakuumna cev s katodo in anodo, med katerima je visoka napetost (200 kV). Ko se kovinska katoda segreje iz nje izhajajo elektroni. Elektroni v električnem polju med katodo in anodo zelo pospešijo in dobijo veliko kinetično energijo. Ko trčijo v anodo, med ustavljanjem svojo energijo oddajo v obliki rentgenskih žarkov. Samo 1% elektronov se spremeni v rtg žarke ostalih 99% pa v toplotno energijo.

## Obsevanje

### Naprava

Na Zavodu republike Slovenije za transfuzijsko medicino od začetka leta 2020 uporabljamo napravo Radgil 2 proizvajalca Giraltoni. RADGIL 2 je medicinski pripomoček, ki uporablja



rentgenske žarke za obsevanje krvnih pripravkov v plastičnih vrečkah z namenom preprečevanja TA-GvHG.

Rentgenski aparat kot vir ionizirajočega sevanja ne uporablja radioaktivnega sevanja. Sevanje oddaja le kratek čas ob vklopu visoke napetosti. Sevanje preneha v nekaj milisekundah po izklopu napetosti. Tudi po daljšem delovanju rentgenski aparat in njegovi sestavni deli ne sevajo. Glede na to, da se med postopkom nastajanja rentgenskih žarkov ustvarja toplotna energija, je aparat med delovanjem potrebno ohlajati. Ohlajamo ga z vodo iz vodovodne napeljave, ki zadošča kriterijem glede pretoka in tlaka in je predhodno omeščana.

### **Vrste vzorcev za obsevanje**

Vzorci za obsevanje so komponente krvi, ki se po obsevanju transfundirajo bolnikom.

Krvni pripravki, ki jih je potrebno obsevati:

- KEF – eritrociti odstranjeni levkociti v ohranitveni raztopini,
- KEK – eritrociti resuspendirani v AB plazmi,
- KTF – trombociti afereza odstranjeni levkociti,
- TFB – trombociti pridobljeni iz polne krvi, zlitje, odstranjeni levkociti,
- KLF – granulociti afereza,
- EOS – eritrociti, odstanjeni levkociti, oprani v ohranitveni raztopini,
- EOF – eritrociti, odstranjeni levkociti, oprani v fiziološki raztopini,
- KLB – koncentrirani levkociti, »buffy coat«.

Obsevan pripravek ne seva!

### **Uporabnost obsevanih krvnih pripravkov**

Eritrocite lahko obsevamo do 14 dni od datuma odvzema. Transfundiramo jih čimprej, najpozneje v 14 dneh po obsevanju. Enote, ki jih ne izdamo v roku 14 dni od obsevanja, damo v uničenje. EOF, EOS in KEK so uporabni 24 ur po obsevanju. TFB in KTF lahko obsevamo kadarkoli znotraj roka uporabnosti, rok uporabnosti se po obsevanju ne spremeni.

Za novorojenčke, nedonošenčke in za intrauterino transfuzijo obsevamo do 5 dni stare eritrocite in jih transfundiramo takoj oz. najpozneje v roku 24 ur po obsevanju.

Sveže zmrznjene plazme, trombocitov »zlitje, obdelani s psoralenom« in trombocitov »afereza, obdelane s psoralenom« ne obsevamo. Zaradi različnih temperatur shranjevanja krvnih pripravkov je pomembno, da KEF in TFB/KTF ne obsevamo skupaj.

### **Postopki ob naročilu obsevanih krvnih pripravkov**

Za naročilo obsevanega krvnega pripravka je potrebno na naročilnici poleg naročila za vrsto pripravka in količine, označiti pod »dodatna obdelava« – obsevani. Sprejem naročila in izdajo krvnega pripravka izvaja srednja, višja ali diplomirana medicinska sestra. Na ustrezen krvni pripravek med pripravo za navzkrižni preizkus nalepi nalepko »OBSEVATI« in pripravek shrani; eritrocite shrani v predal hladilnika »OBSEVANE KOMPONENTE«, trombocite postavi na trombolator. Eritrocite obsevamo, ko so opravljeni vsi laboratorijski testi in je končan navzkrižni preizkus. Vsa dodatna obdelava krvnega pripravka se izvede pred obsevanjem. Obsevanje izvaja usposobljeno osebje z opravljenim tečajem iz varstva pred sevanji.

Pred obsevanjem medicinska sestra odstrani nalepko »OBSEVATI« in nalepi indikator sevanja na sprednjo stran pripravka pod osnovno etiketo. Na indikator predhodno napiše datum in uro obsevanja.

Podatke v obsevalnik vnašamo preko optičnega čitalca in preko tipkovnice v računalniško bazo podatkov obsevalnika. Ko vnesemo vse potrebne podatke (številka in vrsta krvnega pripravka, vrsta indikatorja sevanja), se krvni pripravek postavi v zato pripravljeno posodo. Po končanem obsevanju medicinska sestra pregleda indikator sevanja in ob ugotovitvi, da se je indikator ustrezno obarval nalepi na pripravek nalepko z napisom »OBSEVAN PRIPRAVEK«. Obsevan pripravek do izdaje na kliniko oz. oddelek shranimo na primernem mestu. Pri izdaji krvnih pripravkov še enkrat preverimo indikator sevanja in vse tri liste izdajnice označimo s štampljko »OBSEVAN PRIPRAVEK«.

## Pregled obsevanih pripravkov



### Zaključek

Obsevanje krvnih pripravkov je zanesljiv način preprečevanja nastanka postransfuzijske reakcije presadka proti gostitelju.

Za obsevanje na Zavodu RS za transfuzijsko medicino uporabljamo obsevalnik Radgil 2, ki uporablja rentgenske žarke za obsevanje krvnih pripravkov ter omogoča nadzorovano in validirano odmerjanje količine potrebnega sevanja. Ob tem je pomembno, da je obsevalnik varen za okolje in izvajalce, ki s tem aparatom upravljajo.

### Viri

1. Aleksandra Barbarić Kovačić, Slavica Stanišić, Samo Zver, Reakcija presadka proti gostitelju po transfuziji krvi in kako jo preprečimo, Zdravniški vestnik, april 2021
2. Jaka Kovač, usposabljanje iz varstva pred ionizirajočimi sevanji, Zavod za varstvo pri delu, Ljubljana, 2022
3. User manual, Radgil2, Giraltoni S.p.A, 2019
4. Postopek za ravnanje z opremo. PRO-P.I-26. Ravnanje z obsevalnikom Radgil2. Oddelek za preskrbo s krvjo, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino Ljubljana. Ljubljana, 2022.
5. Standardni operativni postopki. SOP-P.I-51. Sprejem naročila in izdaja obsevanih pripravkov iz krvi. Oddelek za preskrbo s krvjo, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino Ljubljana. Ljubljana, 2022.

## KRVODAJALSTVO IN PRESKRBA S KRVJO (ZTMS)

Zbiranje plazme s postopkom plazmafereze, merila za izbor krvodajalcev, postopek in kontrola kakovosti

*Valentina Filipović Samec, Polonca Mali, Zdravko Kvržič*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*valentina.filipovic-samec@ztm.si*

### Uvod

Plazma je tekoči del krvi, vsebuje vodo (90-92%), 6-8 % različnih beljakovin (albumini, imunoglobulini, faktorji strjevanja krvi), elektrolite. Sestava plazme je odvisna od starosti, spola, prehrane, dednosti, spremembe v sestavi lahko nastanejo kot posledice bolezni. V telesu vzdržuje hemodinamsko homeostazo, opravlja transport hranljivih in končnih produktov presnove, snovi imajo vlogo pri imunskem odzivu organizma.

Plazmo, kot krvno komponento lahko pridobimo s predelavo iz darovane polne krvi ali s posebnim postopkom odvzema plazme na celičnem ločevalcu-plazmaferezo (PLF). Plazmafereza (grško. Aferezis- ločevanje, odvzem) je postopek zbiranja plazme, pri katerem krvodajalcu odzamemo polno kri, izločimo plazmo in vrnemo krvne celice nazaj v krvni obtok, ki ga opravljamo na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (ZTM). Krvodajalcu odzamemo 500 do 700 ml plazme. Postopek odvzema plazme traja približno pol ure.

Prvi princip ločevanja tekočin izhaja iz mlečne industrije, t.im. De Lavalovega ločevalca za pripravo smetane v poznih 1800- tih. Po II. svetovni vojni je ta princip uporabil Edwin Cohn za izdelavo stroja za kontinuirano pretočno centrifugiranje in ločevanje.

### Vrste plazmaferez:

1. Terapevtska plazmafereza, za različna bolezenska stanja :

-avtologna plazmafereza je odvzem /vračanje lastne plazme pri bolniku, pogosto je del postopka zdravljenja ;

-izmenjalna plazmafereza odvzeto plazmo bolnika nadomeščamo s plazmo darovalca, albumini in/ali s fiziološko raztopino.

2. Zbiranje plazme s postopkom plazmafereze pri krvodajalcu ( donorska plazmafereza) , je pridobitev plazme, ki je kot krvna komponenta- sveže zmrznjene plazme (SZP) namenjena za klinično uporabo pri bolniku (zaradi posebnost le plazma moških), kot tudi za namene izdelave zdravil iz krvi.

### **Merila za izbor krvodajalcev za postopek plazmafereze**

Merila za izbor krvodajalcev za ta postopek, so enaka kot veljajo za darovalce polne krvi, z upoštevanjem dodatnih pogojev za varen odvzem in zaščito krvodajalca.

Zaradi potreb po povečanju količine zbrane plazme za izdelavo zdravil iz krvi, kot tudi zaradi vodenja in uravnavanja krvne komponente- eritrocitov, v praksi preusmerjamo krvodajalce na plazmaferezo pri pozitivnem rezultatu direktnega Coombsovega testa (DCT), pri presežku filtriranih koncentriranih eritrocitov (KEF) krvne skupine AB ali K+. Primerni so krvodajalci, ki so vsaj 2-krat uspešno darovali polno kri, in ustrezajo dodatnim merilom za izbor dajalca pred plazmaferezo. Postopki potekajo na posebnih aparatih, zato se morajo krvodajalci na odvzem predhodno telefonsko naročiti, zaradi preverjanja primernosti za darovanje pred prihodom, optimizacije delovnega procesa, glede razpoložljivosti strojev in kadra. S preusmerjanjem krvodajalcev na odvzem krvi s plazmaferezo iz darovanja polne krvi, kadar uravnavamo tudi zaloge krvi določenih krvnih skupin ( zlasti presežkov enot krvi podskupine Kell pozitivna) , tako obstaja velika možnost, da se krvodajalci na vabila k darovanju krvi odzivajo na odvzem tudi v prihodnje. Pred darovanjem plazme, pregledamo še ustreznost žilnega pristopa, pojasnimo postopek odvzema in možnosti neželenih učinkov darovanja.

	Priročila: EDQM 20. IZDAJA	EDQM 21. IZDAJA	ZTM
Izvajanja PLF	Do 33x/letno	Do 33x/letno	
Minimalni interval med posameznimi PLF	96h	1-2 tedna	2tedna
Trombofereza (TRF)/ PLF nato odvzem polne krvi (PK)	48h	48h	
Odvzem polna kri in nato PLF/TRF	1 mesec	4tedne	4tedne
TRF/PLF, nato PLF	/	1-2tedne	4tedne
PLF nato TRF	/	1-2tedne	4tedne
Konc.Hb(g/L)	120 ≤ Ž, 130 ≤ M	120 ≤ Ž, 130 ≤ M	125 ≤ Ž, 135 ≤ M
Celokupni proteini	Vsaj 1x/letno, 60 g/L ≤	Vsaj 1x/letno, 60 g/L ≤	Pred vsakim odvzemom
Določitev konc.IgG g/L	vsaj 1x/letno ali vsako 5. darovanje, kaj je prej, pogostnost darovanja možna: IgG ≤ 6, odklon 3t 6 ≤ IgG ≤ 8, 1x/2tedna 8 ≤ IgG ≤ 10, 1x/ teden 10 < IgG, 1x/teden	vsaj 1x/letno ali vsako 26.darovanje, kaj je prej pogostnost darovanja možna: IgG ≤ 6, odklon 3tedne 6 ≤ IgG ≤ 8, 1x/2tedna 8 ≤ IgG, 1x/teden	/

### Princip postopka v celičnem ločevalcu

Za odvzem uporabljamo aseptični pristop in posebne sete, ki jih namestimo na celični ločevalec. Pred začetkom odvzema fiziološka raztopina navlaži separacijsko komoro, antikoagulantno sredstvo (ACD-A) pa ostali del seta. V fazi črpanja krvi iz vene dajalca, črpalka za kri takoj in samodejno ob nadzorovani hitrosti dodaja ob stiku s polno krvjo ACD-A. Zaradi preprečevanja strjevanja krvi- aktivacije koagulacijskih procesov, na vsakih 100ml polne krvi, dodaja 8ml ACD-A, tako da je razmerje citrat: polna kri 1:12,5. Polna kri pomešana z ACD-A se prečrpa s hitrostjo 120ml/minuto. do ločevalne komore, ki vrtili z visoko hitrostjo s 3600 obrtljivost na minuto. Zaradi delovanja centrifugalnih sil v ločevalni komori, membranske filtracije ali kombinaciji obeh (odvisno od proizvajalca stroja) se celice in plazma v komori ločijo po specifični teži v plasteh, na eritrocite, ki so spodaj, v sredini je levkocitno- trombocitna plast (buffy coat), zgoraj je plast



plazme. V primeru zbiranja plazme, se le ta v zbirno vrečko, ostale se komponente vrnemo darovalcu s hitrostjo 130 ml/min, z ali brez nadomeščanja odvzete tekočine. Proces lahko poteka kontinuirano (slabosti so večji zunajtelesni volumen- ECV in hitrejši pretok) ali intermitentno, v ciklih, do pridobitve zadostne količine plazme.

Pri postopku PLF na celičnem ločevalcu Aurora (Fresenius) , ki ga imamo na ZTM uporabljamo enoigelni pristop, postop je popolnoma avtomatiziran, ECV je le 200 ml , kot tudi razmerje med antikoagulantom in krvjo, omogoča samodejni prenos in arhiviranje podatkov. Odvzem plazme traja približno 30 minut, v 6 ciklih ali več, zberemo od 500-700 ml, odvisno od celokupnega krvnega volumna dajalca, ki ga določimo po nomogramu telesne mase in višine, upoštevamo tudi indeks telesne teže, ki mora biti vsaj 18,5.

Med afereznim postopkom so možni podobni zapleti kot pri darovanju polne krvi. Na mestu vboda v žilo lahko nastane podplutba ali lokalni zaplet, splošni zapleti so slabost, omotica ali vrtoglavica zaradi zmanjšanja krvnega tlaka. Pri aferezi se odvzeta polna kri meša z antikoagulansom, ki veže kalcij, zato vračanje sestavin v krvi z antikoagulansom lahko pri darovalcu sproži pomanjkanje kalcija v krvi z znaki, kot so mravljinčenje v prstih na rokah in nogah, okoli ust in na glavi. V hujših primerih tudi krči v mišicah. Ti znaki zelo hitro izzvenijo, ko upočasnimo postopek afereze ali po zaužitju raztopine kalcija oz. infuziji kalcija.

Ostale neželeni učinki, ki o možni zaradi več pogostih darovanj in odvzemov, so vpliv na gostoto kosti, hipomagneziemija, poslabšanje respiratorne alkalozе, podaljšanje QT-intervala, redko zračna embolija in strojna hemoliza (senzorji ločevalca ob zaznavanju le-teh vstavijo stroj), kot tudi anemija pri krvodajalcu zaradi zmanjšanja zaloga železa.

Neželene učinke spremljamo v sistemu hemovigilance, najpogostejši neželeni učinki ob plazmaferezi pri nas, so tako blage citratne reakcije, hematomi in slabost.

### **Kontrola kakovosti**

Zbrani volumen plazme med postopkom in na koncu plazmafereze vključno z dodanim antikoagulantnim sredstvom ne sme preseči 16% celokupnega krvnega volumna (TBV) dajalca. V tabeli prikazujemo potrebne pogoje v tabeli zgoraj so navedeni pogoji in priložene vrednosti določenih parametrov, ki jih moramo izvajati zaradi zaščite dajalca kot tudi prejemnika in zagotavljanja kakovosti odvzete plazme, ki jih izvajamo po predpisanih časovnih obdobjih.

Zbrani volumen plazme lahko odstopa za  $\pm 10\%$  od navedenega, faktor VIII  $\geq 70$  IU/100 ml po skladiščenju plazme 1 mesec od datuma zbiranja, dovoljena je količina levkocitov pod  $10^6$ /enoto, eritrocitov  $< 6 \times 10^9$ /L, trombocitov  $< 50 \times 10^9$ /L.

## Viri

1. EDQM, 20. Izdaja. Guide to the preparations, use and quality assurance of blood components, 2020 Strasbourg.
2. EDQM, 21. Izdaja. (sprejet rokopis) Guide to the preparations, use and quality assurance of blood components,
3. Winters, J.L. et al. Apheresis: principles and practice, vol.2: Collection of blood components by apheresis; AABB, Maryland, 2021
4. <http://www.ztm.si/krvodajalstvo/posebni-odvzemi/>

## Nova komponenta krvi: patogeno inaktivirana plazma

*Urška Dolinar*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*Urška.dolinar@ztm.si*

V Sloveniji smo v letu 2021 izdali 12391 enot sveže zmrznjene plazme (SZP). Plazmo izdajamo ob masivnih transfuzijah, pri terapevtski izmenjavi plazme, pri koagulopatijah za katere ne obstajajo specifični nadomestiki faktorjev, pri trombotični trombocitopenični purpori ter pri pomanjkanjih faktorjev strjevanja krvi.

Presejanje krvodajalcev ter razvoj občutljivih testov za testiranje krvi na najpogostejše patogene, ki se prenašajo s krvjo, pomembno vpliva k izboljšani varnosti vsake transfuzije. Obvezno testiranje krvi ureja Pravilnik o obveznem testiranju krvi na sledi okužb s povzročitelji bolezni, ki se prenašajo s krvjo. Poleg povzročiteljev okužb, za katere je testiranje obvezno, se v svetu stalno pojavljajo novi patogeni, za katere diagnostični testi niti ne obstajajo. Dokler virusa in njegovih lastnosti ne spoznamo, obstaja tveganje za njihov prenos s transfuzijo.

V letih med 2013 in 2022 smo na ZTM zaznali šest prenosov patogenov z enotami sveže zmrznjene plazme, in sicer virus hepatitisa B (HBV). Natančneje, leta 2013 smo imeli dva prenosa HBV z enotami plazme, leta 2015 smo imeli tri prenose HBV z enotami plazme in v letu 2016 smo zabeležili en prenos HBV z eno enoto sveže zmrznjene plazme. Skupno vsem primerom je, da so bili vsi rezultati virusnega testiranja nereaktivni, saj je bila vsebnost virusa v testiranem vzorcu pod mejo detekcije metode za neposredno ugotavljanje virusne nukleinske kisline (NAT - nucleic acid testing). Bolniki, ki so od istih krvodajalcev prejeli zlitja patogeno inaktiviranih trombocitov, se niso okužili.

Za zagotavljanje čim bolj varne krvi odvzete bodisi v obdobju diagnostičnega okna bodisi testiranje za določenega povzročitelja ne obstaja ali se ga ne izvaja, so razvili metode za patogeno inaktivacijo.

Tak proaktiven način preprečevanja s transfuzijo prenesenih okužb (angl. transfusion transmitted infection -TTI) v transfuzijskih ustanovah je postopek patogene inaktivacije. Cilj vsake patogene inaktivacije je zmanjšanje števila povzročiteljev bolezni pod infektivno dozo. Za to lahko v transfuzijskih ustanovah uporabljamo metodo z metilenskim modrilom, metodo inaktivacije z riboflavinoma ali amotosalenom v kombinaciji z UVA svetlobo. V industrijskem okolju se uporablja tudi metoda s topilom/detergentom (angl. solvent-detergent - S/D). Vsaka od

metod ima svoje omejitve. Metoda z metilenskim modrilom je neučinkovita proti intracelularnim virusom ter nekaterim bakterijam, metoda topilo/detergent inaktivira le viruse z lipidno ovojnico, metoda z riboflavinom ali amotosalenom ne inaktivira virusa HAV, HEV ter poliovirusa.

Slednjo metodo v Sloveniji od leta 2009 uporabljamo za patogensko inaktivacijo enot trombocitov, zato smo na Zavodu RS za transfuzijsko medicino validirali tudi postopek za PI plazme.

Postopek patogene redukcije z metodo z amotosalenom in UVA osvetljevanjem omogoča inaktivacijo patogenov in levkocitov, s čimer se zniža možnost prenosa s transfuzijo povezane okužbe in s transfuzijo povezane bolezni presadka proti gostitelju. Derivat psoralena amotosalen, dobro prehaja celično membrano in celično steno ter se z veliko afiniteto veže na pirimidinske baze nukleinskih kislin. Pod vplivom UV-A žarkov tvori kovalentne vezi, ki nepovratno preprečijo podvajanje nukleinskih kislin.

Metoda omogoča uspešno inaktivacijo širokega spektra patogenov: Gram negativne bakterije (*Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Anaplasma phagocytophilum*), Gram pozitivne bakterije (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*), virusi z in brez ovojnice (HIV-1, DHBV (model za HBV), BVDV (model za HCV), HTLV-I, HTLV-II, WNV, Chikungunya, Influenza A, SARS-Associated Coronavirus, Parvovirus B-19, Bluetongue virus, Adenovirus), praživali (*Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *Babesia microti*), spirochete (*Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*). Ta postopek inaktivira tudi limfocite T učinkoviteje kot alternativni postopki z obsevanjem. Ne inaktivira pa nekaterih virusov brez ovojnice (HAV, HEV, poliovirus) ter spore *Bacillus cereus*.

Pri samem postopku uporabljamo INTERCEPT set za plazmo, ki vsebuje 15 ml 6 mM amotosalena, vrečko za obsevanje, pretočno blazinico za absorpcijo preostalega amotosalena (CAD) in tri 400 ml EVA vrečke za dolgoročno shranjevanje zmrznjene plazme. Vrečko s filtrirano aferezno plazmo sterilno povežemo s setom za inaktivacijo. Plazmo in fotosenzibilizator amotosalen pretočimo v vrečko za obsevanje. Tekočino premešamo, iztisnemo zrak ter odvarimo od primarne vrečke. Zmes tekočin v obsevalni vrečki vložimo v aparat za obsevanje z UVA žarki. Aparat za fotoinaktivacijo z močjo 3 J/mm<sup>2</sup> osvetluje pripravek z UVA žarki 7 do 9 minut. Po obsevanju plazmo pretočimo skozi disk z adsorbentom, ki veže preostali (nevezani) amotosalen iz pripravka. Tako je v končnem pripravku koncentracija rezidualnega amotosalena manjša kot 2 µM. Obsevano plazmo odzračimo ter enakomerno razdelimo v končne vrečke primerne za zamrzovanje. Tako plazmo lahko hranimo na temperaturi nižji od -25°C do 24 mesecev.

Naziv krvne komponente, ki jo z opisanim postopkom dobimo je »plazma, afereza, odstranjeni levkociti, obdelani s psoralenom« (PAP). Pripravek je primeren za klinično uporabo, če vse meritve vsebnosti FVIII in fibrinogena dosegajo zahteve znotraj standardov kakovosti, ki jih predpisujeta pravilnik in Priporočila Sveta Evrope, ter je prijavljen pri JAZMP kot nova komponenta.

Glede na to, da so bile donacije trombocitov istih krvodajalcev (glej zgoraj) patogensko inaktivirane in niso prenesle okužbe (HBV) na prejemnike, retrogradno sklepamo, da bi patogenska inaktivacija plazme uspešno inaktivirala tudi prisotne viruse v plazmi in do prenosa virusa ter razvoja bolezni ne bi prišlo.

## Viri

1. Singh Y, Sawyer LS, Pinkoski LS, Dupuis KW, Hsu JC, Lin L, et al. Photochemical treatment of plasma with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light inactivates pathogens while retaining coagulation function. *Transfusion*. 2006;46(7):1168.
2. Irsch J, Pinkoski L, Corash L, Lin L. INTERCEPT plasma: Comparability with conventional fresh-frozen plasma based on coagulation function - An in vitro analysis. *Vox Sang*. 2010;98(1):47–55.
3. Lanteri MC, Santa-Maria F, Laughunn A, Girard YA, Picard-Maureau M, Payrat JM, et al. Inactivation of a broad spectrum of viruses and parasites by photochemical treatment of plasma and platelets using amotosalen and ultraviolet A light. *Transfusion*. 2020;60(6):1319–31.
4. Bakkour S, Chafets DM, Wen L, Dupuis K, Castro G, Green JM, et al. Assessment of nucleic acid modification induced by amotosalen and ultraviolet A light treatment of platelets and plasma using real-time polymerase chain reaction amplification of variable length fragments of mitochondrial DNA. *Transfusion*. 2016;56(2):410–20.
5. Candotti D, Assennato SM, Laperche S, Allain JP, Levicnik-Stezinar S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose. *Gut*. 2019;68(2):313–21.
6. Prowse C. Properties of Pathogen-Inactivated Plasma Components. *Transfus Med Rev*. 2009;23(2):124–33.
7. Castro G, Merkel PA, Giclas HE, Gibula A, Andersen GE, Corash LM, et al. Amotosalen/UVA treatment inactivates T cells more effectively than the recommended gamma dose for prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Transfusion*. 2018;58(6):1506–15.
8. Cid J. Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease with pathogen-reduced platelets with amotosalen and ultraviolet A light: a review. *Vox Sang*. 2017;112(7):607–13.

9. European Directorate for the Quality of Medicine & HealthCare (EDQM). Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Strasbourg: EDQM; 2020. p. 254-258.
10. Pravilnik o zbiranju, pripravi, shranjevanju, razdeljevanju in prevozu krvi in komponent krvi (ULRS 9/07)

## IMUNOHEMATOLOGIJA (ZTMS)

### Predstavitev kliničnega primera bolnika z aloprotitelesi anti-Co(b)

*Aleksandra Bajt, Ivica Marić*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*aleksandra.bajt@ztm.si*

Termin krvna skupina (KS) se običajno nanaša na posameznikovo kombinacijo antigenov na površini eritrocitov. Antigeni (Ag) so specifična mesta na različnih membranskih proteinih, glikoproteinih ali glikolipidih, na katere se lahko odziva imunski sistem. Ti proteini imajo različne funkcije: membranski transporterji (tudi Colton Ag), receptorji in adhezijske molekule, regulatorni glikoproteini komplementa, encimi, strukturne komponente ali komponente glikokaliksa. Na Ag se vežejo protitelesa (Pt), ki so prisotna bodisi naravno, kot odziv na ubikvitarne antigene v okolju, bodisi pridobljena z aktivno imunizacijo po stiku s tujimi eritrocitnimi Ag, najpogosteje po transfuzijah ali nosečnostih. Prisotnost ali odsotnost dedovanih različic Ag na eritrocitih določa posameznikovo KS. Krvnoskupinski sistemi so po definiciji sistemi enega ali več antigenov, ki jih določa eden ali več povezanih homolognih genov. Delovna skupina za imunogenetiko eritrocitov in terminologijo krvnih skupin ISBT (*angl.* The International Society of Blood Transfusion) je do decembra 2022 potrdila 44 krvnoskupinskih sistemov z 354 eritrocitnimi Ag, ki jih določa 49 genov.

Krvnoskupinski sistem Colton (ISBT 015) vključuje 4 Ag: Co(a), ki je z 99,8 % visokoprevalenčen antigen; polimorfen Co(b), ki je njegov antitetični antigen in ima prevalenco 8,5 % pri potomcih Evropejcev, pri ostalih etničnih skupinah pa je redkejši. Co3 in Co4 sta prav tako visokoprevalenčna antigena, Co3 je prisoten na vseh celicah, razen tistih, ki so fenotipa Co(a-b-). Najpogostejša fenotipa sta Co(a+b-) in Co(a+b+), ostali so redki (Tabela 1). Ag so rezistentni na delovanje proteolitičnih encimov. Colton Ag so del membranskega glikoproteina akvaporina-1 (AQP1), ki tvori vodni kanalček. Je 269 aminokislilin velik produkt *akvaporin-1* gena (*AQP1*), ki se nahaja na kratkem kraku kromosoma 7 (7p14). Šest  $\alpha$ -heliksov prehaja membrano, imajo pet zank; ena ekstracelularna (E) in ena citoplazemska (B), vsaka z asparagin-prolin-alanin (NPA) sekvenco. Pri prehodu skozi membrano tvorita vodni kanalček. AQP1 se povezujejo v tetramere, na posameznem eritrocitu je od 120.000 do 160.000 molekul AQP1. Nahajajo se še v ledvicah (na apikalnih in bazolateralnih membranah proksimalnih tubulov, tankih descendentnih delih

Henlejevih zank in vasa recta descendens), endotelijih kapilar, pljučih, možganih, jetrih in žolčniku ter na različnih strukturah očesa. AQP1 omogočajo > 70 % resorpcije vode v ledvicah, hitro rehidracijo eritrocitov in regulirajo permeabilnost žil v pljučih. Njihova odsotnost pomeni motnjo v homeostazi vode, okrnjena je funkcija koncentriranja urina v ledvicah in manjša površina ter krajša življenjska doba eritrocitov.

Protitelesa anti-Co so večinoma IgG razreda, nekatera imajo zmožnost vezave komplemента. Z indirektnim Coombsovim testom (ICT) dobimo pozitivno reakcijo, reaktivnost se ojača s testnimi celicami, obdelanimi s proteazami. Nekatera Pt anti-Co lahko povzročajo hudo hemolitično bolezen ploda in novorojenčka (HBPN), druga akutne ter odložene hemolitične transfuzijske reakcije (HTR). Anti-Co(b) so redka Pt, večinoma jih najdemo pri pacientih, pri katerih so prisotna še druga eritrocitna Pt. So IgG razreda, redko vežejo komplement. Lahko povzročijo akutne in blage do zmerne odložene HTR, v strokovni literaturi ni poročil o hudih HBPN. Priporočene so transfuzije enot koncentriranih eritrocitov (KEF) z negativnimi navzkrižnimi preizkusi.

Dne 21. 10. 2022 so v dežurni službi za 65-letnega bolnika s transplantirano ledvico in krvavitvijo naročili iz Kliničnega oddelka za nefrologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (KON UKCLJ) – Centra za transplantacijo ledvic najprej 4, nato pa še 4 enote KEF. Bolniku so leta 2012 transplantirali ledvico zaradi ledvične odpovedi ob avtosomno dominantni policistični bolezni ledvic in jeter, sedaj počasi odpoveduje tudi presadek. Je po operaciji adenokarcinoma želodca leta 2019, zaradi cist jeter in ponavljajočih se okužb le-teh je prišlo do ciroze in poslabšanja funkcije jeter. Ni več kandidat za novo transplantacijo ledvice, v času pisanja tega prispevka je bil ponovno hospitaliziran na KON zaradi sepse. Pred odkritjem aloprotiteles anti-Co(b) je od leta 2012 prejel 20 enot KEF in skupno 14 aferetskih in trombocitnih zlitij (TAP/TBP). Na dan naročila je bil 1 od 8 AHG majorjev ponovljivo pozitiven, direktni Coombsov test (DCT) te enote KEF pa negativen. Prav tako sta bila negativna strojno izvedena indirektni Coombsov test (ICT) Grifols Serascan Diana 4 in indirektni test z encimom papainom (IT-P) Grifols Serascan Diana 4P (Tabela 2). Avtokontrola je bila negativna. Ročno opravljena ICT BioRad ID-DiaCell I-II-III in ICT-P BioRad ID-DiaCell IP-IIP-IIIP sta bila z eno od testnih celic primerljivo pozitivna 2+, zato je bila sprva narejena specifikacija eritrocitnih protiteles v plazmi L/C z dodatkom encima papaina (BioRad ID-DiaPanel-P) in postavljen sum na prisotnost redkih aloprotiteles anti-Co(b). Za potrditev je bilo opravljenih še več specifikacij eritrocitnih Pt v plazmi: Grifols Identisera Diana, Immucor Panocell-20, BioRad Biotestcell-I11. Povsod je bila prisotna reaktivnost z bodisi Co(b+) celicami bodisi z nekaterimi na Co(b) netestiranimi celicami. Bolniku smo določili še eritrocitne antigene: D+C+E-c-e+, Co(b-). Izdali smo enote KEF z negativnimi navzkrižnimi preizkusi. Naknadno smo v rednem delovnem času na Co(b) testirali izdane enote KEF (vse negativne) in netestirani pozitivni celici ICT BioRad ID-DiaCell I-II-III in ICT-P BioRad ID-DiaCell IP-IIP-IIIP, ki sta bili pozitivni na Co(b) Ag.



V plazmi bolnika smo dokazali prisotnost zelo redkih eritrocitnih aloprotiteles anti-Co(b). Verjetno je prišlo do imunizacije s katero od dotlej prejetih enot KEF. Protitelesa anti-Co(b) lahko v primeru Co(b+) transfuzije eritrocitov po strokovni literaturi povzročijo akutno ali blago do zmerno odloženo hemolitično transfuzijsko reakcijo. Bolnik sme prejemati le Co(b-) enote KEF na podlagi dokončanih negativnih navzkrižnih preizkusov. Zaradi časovne oddaljenosti od transplantacije ledvice nismo mogli preveriti, če je bil donor Co(b+). AQP1 so prisotni na različnih ledvičnih strukturah, ni pa znano, ali so izpostavljeni delovanju imunskega sistema tudi Co Ag in ali bi imela prisotnost Pt anti-Co(b) v primeru Co(b+) donorske ledvice negativne posledice na delovanje transplantiranega organa.

FENOTIP	PREVALENCA (v večini populacij)
Co(a+b-)	90 %
Co(a-b+)	0,5 %
Co(a+b+)	9,5 %
Co(a-b-)	<0,01 %

Tabela 1: Pogostnost Co fenotipov

PREISKAVA	TEHNIKA	REZULTAT
Indirektni Coombsov test (ICT) (BioRad ID-DiaCell I-II-III)	gel, antihumani globulin (AHG)	pozitiven
Indirektni Coombsov test (ICT) – P (BioRad ID-DiaCell IP-IIP-IIIP)	gel, AHG, encim papain	pozitiven
Specifikacija eritrocitnih protiteles (Pt) v plazmi (Grifols Identisera Diana, Panocell-20, BioRad Biotestcell-I11)	gel, AHG	prisotna aloprotitelesa <b>anti-Co(b)</b>
Specifikacija eritrocitnih protiteles (Pt) v plazmi – P (BioRad ID-DiaPanel-P)	gel, AHG, encim papain	prisotna aloprotitelesa <b>anti-Co(b)</b>
Eritrocitni antigeni	gel	D+C+E-c-e+, <b>Co(b-)</b>

Tabela 2: Opravljene imunoematološke preiskave

## Viri

1. Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM, ed. Technical Manual. 20th ed., Bethesda: AABB; 2020. p. 375-376.
2. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. The Blood Group Antigen. FactsBook. 3rd ed., Waltham: Elsevier; 2012. p. 457-466.
3. Daniels G. Human Blood groups, 3rd ed., Chichester: Wiley-Blackwell; 2013. p. 384-390.
4. ISBT Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology, dostopano 15.3.2023 na <https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt.html>.
5. Halverson GR, Peyrard T. A review of the Colton blood group system. *Immunohematology*, 2010;26(1):22-26.
6. Issitt PD, Anstee DJ. Applied Blood Group Serology, 4th ed. Durham: Montgomery Sientific Publications; 1998. p. 695-702.
7. Daniels G. Function of red cell surface proteins. *Vox Sang*. 2007;93:331-340.
8. Su W, Cao R, Zhang X, Guan Y. Aquaporins in the kidney: physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2020;193-203.

## Potrjevanje eritrocitnih antigenov v sklopu navzkrižnih preizkusov

*Katja Berk Lahajner, Ivica Marić*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*katja\_berk-lahajner@ztm.si*

Pri kroničnih prejemnikih transfuzij je preprečevanje aloimunizacij izjemnega pomena, saj le-te poleg tveganja za hemolitične posttransfuzijske reakcije pomenijo več (kompleksnejših) seroloških preiskav, podaljšan čas do izdaje krvnih komponent in višji strošek celotne storitve.

S številom transfundiranih enot eritrocitov se sorazmerno večja verjetnost aloimunizacije, zato je zaradi zagotavljanja antigensko skladnih komponent kroničnim prejemnikom in s tem povezane njihove tipizacije bistvenega pomena pravočasno seznanjanje transfuzijskega centra s pacientovo diagnozo oz. potekom bolezni.

Začetne stroške fenotipizacije transfundiranih enot lahko zmanjšamo tako, da pri predhodno tipiziranih enotah eritrocitov antigenov ne potrjujemo vedno znova, razen v primeru prisotnih specifičnih protiteles za določene antigene. Več kot 70% novonastalih protiteles je usmerjenih v antigene sistema Rh in K, zato se postavlja vprašanje ali je smiselno preventivno zagotavljanje antigensko skladnih enot zunaj tega okvirja.

Pri nas je praktično vsak krvodajalec ob prvi donaciji tipiziran v Rh sistemu in K, kar nam omogoča široko bazo takoj dostopnih fenotipov za antigene iz omenjenih skupin.

Priporočila za zagotavljanje antigensko skladnih eritrocitov so povzeta po smernicah Britanskega združenja za transfuzijsko medicino (BCSH Guidelines, 2012). SOP na Zavodu RS za transfuzijsko medicino jim sledijo, morebitne razlike so opisane v *ležečem tisku*.

### **Aloprotitelesa**

Klinično pomembna aloprotitelesa so po definiciji tista protitelesa, ki so reaktivna v testu z AHG pri 37st.C. V to skupino sodijo protitelesa proti eritrocitnim antigenom Rh sistema, Kk, Jk(a,b), M,S,s,U in Fy(a,b). V vseh teh primerih je smiselno zagotavljati tudi potrjeno K- eritrocite, saj je anti-K v prisotnosti drugih aloprotiteles težko izključiti. Pacientu s protitelesi iz sistema Rh naj bi zagotavljali skladne komponente v celotnem Rh sistemu z namenom preprečevanja nadaljnjih aloimunizacij. Potrjeno antigensko negativna enota mora biti izdana tudi v primeru, da so

trenutno sicer že znana protitelesa pod mejo detekcije. V primeru nizkofrekvenčnih klinično pomembnih protiteles (npr. anti-Wr) so enote lahko izdane na osnovi dokončnega negativnega križnega preizkusa, razen v primeru, ko gre za multipla aloprotitelesa - takrat moramo zagotoviti za inkriminiran antigen negativne enote. Tudi v primeru klinično nepomembnih aloprotiteles izdamo eritrocite na osnovi negativnega križnega preizkusa; kadar je protitelo reaktivno pri nizkih temperaturah, moramo navzkrižni preizkus narediti pri 37st.C (Tabela 1).

## AIHA

Pacienti z novoodkrita avtoimunska hemolitično anemijo so še posebej podvrženi tveganju za odložene hemolitične transfuzijske reakcije zaradi možnega sočasnega obstoja klinično pomembnih aloprotiteles, ki naj bila v takih primerih prisotna v 20-40%. Ker je v primeru močno reaktivnih avtoprotiteles odkrivanje aloprotiteles oteženo oz. omejeno s številom adsorbcij, je zagotavljanje razširjeno antigensko skladne krvi bistvenega pomena, s čimer preprečujemo tudi morebitne nove senzibilizacije.

Navzkrižne preizkuse delamo z alo- oz. avtoadsorbirano plazmo, saj so z nativno plazmo običajno pozitivni.

*V kolikor pacient nima prisotnih aloprotiteles, potrjevanje eritrocitnih antigenov ni potrebno in zadostuje izbira razširjeno antigensko skladnih eritrocitov (za klinično pomembne antigene) po izpisu (t.j. predhodno tipiziranih krvodajalcev).*

## Terapija s tarčnimi monoklonskimi protitelesi (update BCSH Guidelines 25.4.2017)

Monoklonska protitelesa motijo serološko predtransfuzijsko testiranje (pozitiven ICT in navzkrižni preizkusi) in s tem podaljšajo čas do izdaje krvnih komponent. V teh primerih je zato komunikacija med klinikom in transfuziologom ključnega pomena. Pred pričetkom terapije z monoklonskimi protitelesi je potrebno zagotoviti feno/genotipizacijo pacienta v ABO, Rh CcDEe, MNSs, K(k če je K+), Jk(a,b), Fy(a,b) sistemih in izključiti morebitna aloprotitelesa oz. jih identificirati. Zagotavljanje popolnoma skladnih komponent običajno ni mogoče.

Anti-CD38 (DARATUMUMAB): ne vpliva na testiranje KS, moti pa testiranja z anti-humanimi globulini. Po pričetku terapije določamo ABO in Rh z običajnimi metodami, za izključevanje /identifikacijo protiteles in navzkrižne preizkuse pa je potrebno izničiti učinek anti-CD38, za kar uporabimo obdelavo reagenčnih eri z ditiotreitolum (DTT). DTT uniči antigene sistema Kell, zato je potrebno zagotavljati K- eritrocite, razen v primeru, ko je pacient znan K+ in v redkih primerih tudi k- (takrat zagotavljamo tudi k- eri).

Anti CD-47 (CAMELIA): CD47 je izražen tako na tkivnih celicah kot na eritrocitih. Terapija z anti-CD47 se vpleta tako v testiranje KS ABO in Rh, kot tudi v presejani test za določanje protiteles (ICT) in njihovo identifikacijo, DCT in/ali AC. Pred uvedbo terapije je potrebno (tako kot pri anti-CD38) določiti ABO in Rh, prisotnost/identifikacijo aloprotiteles in razširjeno feno-/genotipizacijo pacienta. Po uvedbi zdravljenja testiramo KS kot običajno; če je ni možno določiti, zagotovimo eri skupine 0. Poslužujemo se metode z adsorbacijami.

Pri obeh terapijah je namen razširjene Ag tipizacije zagotavljanje eritrocitov skladnih v sistemu Rh in Kell ter zagotavljanje dodatnih informacij v primeru aloimunizacije. V primeru, da specifična aloprotitelesa niso prisotna, britanske smernice priporočajo zagotavljanje skladnosti le v sistemu Rh in Kell. Obsežnejšega Ag ujemanja se poslužujemo le v primeru, ko z adsorbacijami ne uspemo izključiti/identificirati aloprotiteles ali v primerih, ko le-ta dokažemo. *Na ZTM je praksa zagotavljanja razširjeno Ag skladnih eritrocitov po uvedbi anti-CD38 podobna, le da že v preventivne namene ob odsotnosti protiteles skušamo zagotoviti eritrocite skladne v čimveč klinično pomembnih antigenih (glej tabelo), ki pa jih potrjujemo samo v primeru alosenzibilizacij.*

### **Kronični prejemniki transfuzij**

a) Srpastocelična anemija (SCA) : zaradi visoke incidence aloprotiteles pri teh pacientih so pogoste hude hemolitične transfuzijske reakcije. Zato je nujno zagotavljanje čimbolj široko antigensko skladnih eritrocitov (minimalno v Rh in Kell sistemu), kar preprečuje tudi nove alosenzibilizacije.

b) Ne-SCA: talasemije, aplastična anemija, paroksizmalna nočna hemoglobinurija (PNH), mielodisplastični sindrom (MDS). Aloimunizacija pri teh skupinah ni tako pogosta, zato zadostujejo profilaktično skladni eritrociti v Ag sistemih Rh in K.

*Na ZTM v obeh primerih zagotavljamo enote eritrocitov, skladne v klinično pomembnih antigenih, ki pa jih dodatno potrejujemo samo v primeru alosenzibilizacij.*

Tabela 1

<b>SISTEM</b>	<b>SPECIFIČNOST</b>	<b>KLINIČNA POMEMBNOST pri transfuziji</b>	<b>PRIPOROČILO ZA IZBIRO ERI ZA TRANSFUZIJO</b>
<b>ABO</b>	Anti-A1	Ne	neg AHGM 37stC
<b>Rh</b>	<b>Anti-D,-C,-c,-E,-e</b>	<b>Da</b>	<b>Ag neg</b>
<b>Rh</b>	Anti-Cw	Ne	neg AHGM*
<b>Kell</b>	<b>Anti-K,-k</b>	<b>Da</b>	<b>Ag neg</b>
<b>Kell</b>	Anti-Kpa	Ne	neg AHGM*
<b>Kidd</b>	<b>Anti-Jka,-Jkb</b>	<b>Da</b>	<b>Ag neg</b>
<b>MNS</b>	<b>Anti-M (reakt.pri 37st.C)</b>	<b>Da</b>	<b>Ag neg</b>
<b>MNS</b>	Anti-M (nereakt.pri 37st.C)	Ne	neg AHGM 37stC
<b>MNS</b>	Anti-N	Ne	neg AHGM 37stC
<b>MNS</b>	<b>Anti-S,-s,-U</b>	<b>Da</b>	<b>Ag neg</b>
<b>Duffy</b>	<b>Anti-Fya,-Fyb</b>	<b>Da</b>	<b>Ag neg</b>
<b>P</b>	Anti-P1	Ne	neg AHGM 37stC
<b>Lewis</b>	Anti-Lea,-Leb,-Lea+b	Ne	neg AHGM 37stC
<b>Lutheran</b>	Anti-Lua	Ne	neg AHGM 37stC
<b>Diego</b>	Anti-Wra (anti-Di3)	Da	neg AHGM*
<b>H</b>	Anti-HI (pri A1 in A1B skup.)	Ne	neg AHGM 37stC
<b>Vsi</b>	Aktivni pri 37st.C z AHG	Da	Individualno

\* Pravilo velja le v primeru, ko je to edino protitelo. Če se pojavlja v kombinaciji z drugimi, je potrebno zagotoviti antigensko skladno kri.

\*\* Tabela povzeta po BCSH Guidelines 2012

## Zaključek

Potrjevanje eritrocitnih antigenov v sklopu navzkrižnih preizkusov se izvaja v primeru senzibilizacij za klinično pomembna protitelesa, medtem ko je zagotavljanje antigensko skladnih enot (predvsem v sistemu Rh in K) pomembno pri kroničnih prejemnikih transfuzij, prisotnosti toplih avtoproteles in terapiji s tarčnimi monoklonskimi protitelesi.

## Viri

1. Milkins C, Berryman J, Cantwell C, Elliott C, Haggas R, Jones J, et al. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *Transfusion Medicine*. 6. februar 2013;23(1):3–35.
2. Lin Y, Saskin A, Wells RA, Lenis M, Mamedov A, Callum J, et al. Prophylactic RhCE and Kell antigen matching: impact on alloimmunization in transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndromes. *Vox Sang*. 2017;112(1).
3. Trompeter S, Massey E, Robinson S. Position paper on International Collaboration for Transfusion Medicine (ICTM) Guideline 'Red blood cell specifications for patients with hemoglobinopathies: a systematic review and guideline'. *Br J Haematol*. 21. maj 2020;189(3):424–7.
4. Evers D, Middelburg RA, de Haas M, Zalpuri S, de Vooght KMK, van de Kerkhof D, et al. Red-blood-cell alloimmunisation in relation to antigens' exposure and their immunogenicity: a cohort study. *Lancet Haematol*. junij 2016;3(6):e284–92.

## Razreševanje diskrepantnih rezultatov testiranja v sistemu ABO

*Erika Hrastar, Ivica Marić*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*erika.hrastar@ztm.si*

### Uvod

ABO sistem je leta 1900 odkril Karl Landsteiner in še vedno ostaja najpomembnejši krvnoskupinski sistem v transfuzijski medicini. ABO antigene najdemo predvsem na eritrocitih, v manjših količinah pa so prisotni tudi na trombocitih, endoteliju, ledvicah, srcu, črevesju, pljučih, pri sekretorjih tudi v telesnih tekočinah. Transfuzija ABO neskladne krvi lahko povzroči akutno intravaskularno hemolizo, transplantacija ABO neskladnih organov pa lahko vodi v hiperakutno humoralno zavrnitveno reakcijo. In ravno zaradi resnih posledic povezanih s transfuzijo/transplantacijo ABO neskladnih krvnih komponent/organov je pravilna določitev krvne skupine ABO temelj za varno predtransfuzijsko testiranje in ključni del predtransplantacijske priprave.

### Krvnoskupinski sistem ABO

ABO krvnoskupinski sistem obsega štiri glavne krvne skupine (KS): A, B, O in AB. Prisotnost antigenov ABO in s tem fenotipskega izražanja krvne skupine je odvisna od delovanja glikoziltransferaz. Pri posameznikih s krvno skupino O je prisoten t.i. antigen H, ki je prekurzor tako za antigen A kot antigen B. Kateri antigen se bo razvil je odvisno od prisotnosti oligotransferaz, ki dodajajo različne oligosaharide na antigen H ter tako tvorijo antigen A oz. B.

Zgoraj naštetih štiri fenotipi so serološko določeni glede na prisotnost oz. odsotnost antigena A in antigena B na eritrocitih ter prisotnost oz. odsotnost protiteles (t.i. izohemaglutininov) v plazmi, ki so usmerjena proti manjkajočim antigenom. To pomeni, da so antigeni in protitelesa v obratnem sorazmerju, kar opisuje t.i. Landsteinerjevo pravilo. Ob serološki določitvi krvne skupine imamo tako dvojno kontrolo, ujemati se morata direktni del KS (prisotnost antigenov na eritrocitih) in reverzni del KS (prisotnost izohemaglutininov v plazmi). Pričakovane rezultate serološke določitve KS ob rutinskem testiranju si lahko ogledate v tabeli 1.



Tabela 1: Pričakovani rezultati ob serološki določitvi krvne skupine ABO in prevalenca določenih fenotipov v evropski populaciji

Reakcija eritrocitov z reagenčnimi protitelesi (direktni del KS)		Reakcija seruma/plazme z reagenčnimi eritrociti (reverzni del KS)			Interpretacija	Prevalenca (%) v evropski populaciji
<b>Anti-A</b>	Anti-B	A1	B	O	ABO KS	
<b>0</b>	0	+	+	0	0	45
<b>+</b>	0	0	+	0	A	40
<b>0</b>	+	+	0	0	B	11
<b>+</b>	+	0	0	0	AB	4
<b>0</b>	0	+	+	+	Bombay*	redko

\*Bombay je redka avtosomno recesivna krvna skupine, opredeljena z odsotnostjo antigenov H, A in B antigenov na eritrocitih in sekrecijah.

Poleg štirih glavnih fenotipov ABO poznamo tudi celo vrsto podskupin ABO, ki jih običajno odkrijemo zaradi odstopanj med direktnim in reverznim delom KS oz. zaradi šibkejših reakcij ob testiranju. V nadaljevanju bomo predstavili najpogostejše vzroke za diskrepance ob določitvi krvne skupine ABO ter kako jih razrešujemo.

### Diskrepance ob testiranju ABO

Do odstopanj ob določitvi krvne skupine ABO lahko pride zaradi več vzrokov. Za lažjo opredelitev zato diskrepance razdelimo v 3 večje skupine:

- odstopanja ob testiranju eritrocitov,
- odstopanja ob testiranju plazme/seruma
- tehnične težave ob testiranju.

Odstopanja ob testiranju eritrocitov (nepričakovani rezultati v direktnem delu KS):

- Šibka ekspresija antigenov: podskupina ABO, levkemija in druge maligne bolezni, nosečnost, transfuzija, transplantacija, otroci do 4. leta starosti (nezrelost prekurzorjev ABO), prebitek topnih substanc KS.
- Dodatna reaktivnost: avtoaglutinini, hladna protitelesa, visoke koncentracije serumskih proteinov, protitelesa proti sestavinam reagentov, transfuzija, transplantacija, pridobljeni fenotipi (npr. pridobljeni B), poliaaglutinacija.
- Dvojnocelična populacija: nedavna transfuzija, transplatacija, podskupina ABO (npr. A3), himerizem, mozaicizem, fetomaternalna krvavitev.

Odstopanja ob testiranju plazme/seruma (nepričakovani rezultati v reverznem delu KS):

- Šibka reakcija: starost < 4-6 mesecev (endogena sinteza anti-A in anti-B se začne v starosti 3-6 mesecev), podskupina ABO, hipogamaglobulinemija, transplantacija KMC, hemodilucija, prozone efekt, odsotnost anti-A pri pacientih na imunoglobulinih živalskega izvora (konjskih), odsotnost anti-B pri otrocih na dolgotrajni parenteralni/enteralni prehrani in v sterilnem okolju (vzrok pojava izohemaglutininov naj bi bile črevesne in okoljske bakterije, saj vsebujejo ABO podobne strukture, na katere se senzibiliziramo in tvorimo protitelesa).
- Dodatna reaktivnost: hladna avto- ali aloprotitelesa, protitelesa proti sestavinam reagenta, prebitek serumskih proteinov, roloji, fibrin, transfuzija plazemskih komponent, transplantacija, infuzija intravenskih imunoglobulinov, anti-CD47.

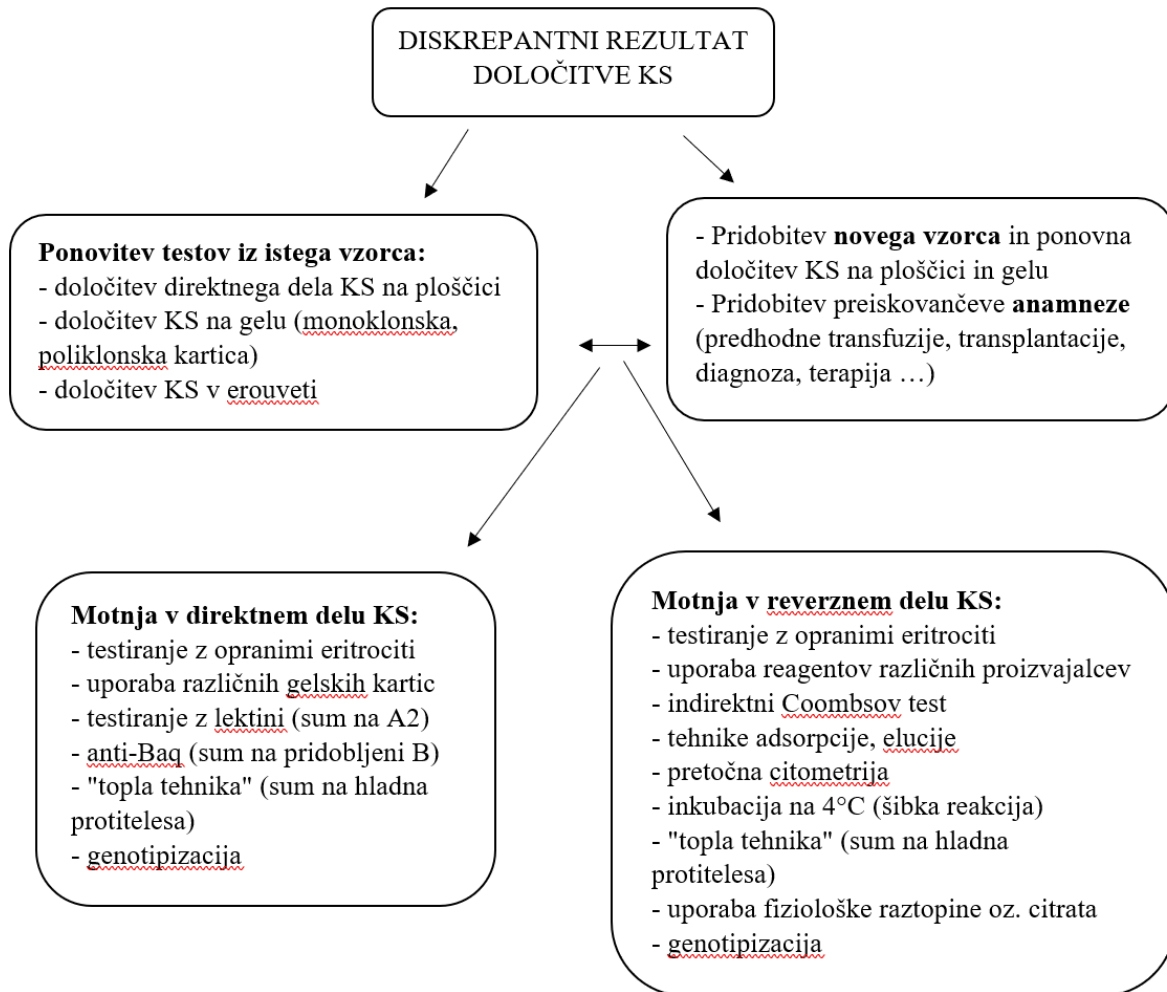
Tehnične težave ob testiranju:

- zamenjava vzorcev, premočne oz. prešibke suspenzije eritrocitov, hemoliza, neupoštevanje navodil proizvajalca.

## Razreševanje diskrepanc ABO

Algoritem testiranja in možne metode, ki jih uporabimo ob diskrepantnih rezultatih določitve KS, so predstavljeni na shemi 1.

Shema 1: Razreševanje ABO diskrepanc



Prva stopnja v razreševanju diskrepantnih rezultatov je ponovitev testa z istim vzorcem, s tem izključimo možnost tehnične napake. Ob sumu na WBIT (napačna kri v epruveti) zaprosimo za nov vzorec krvi in preiskave ponovimo z novim vzorcem. Pridobimo tudi preiskovančevo anamnezo.

Metode in tehnike, ki jih uporabimo v nadaljevanju so odvisne od vrste odstopanja. Uporabimo lahko različne gelske kartice (monoklonske, poliklonske). V primeru suma na prebitek plazemskih proteinov testiranje ponovimo z opranimi eritrociti. Ob prisotnih hladnih aglutininih uporabimo t.i. toplo tehniko, ko vzorec in nato tudi gelsko kartico inkubiramo na 37°C.

V primeru šibkih reakcij v reverznem delu KS se večkrat poslužujemo inkubacije na 4°C, saj so izohemaglutinini običajno razreda IgM in so močnejše reaktivni na hladnem. Uporabimo lahko tudi metode adsorpcije in elucije ter pretočno citometrijo. Za razlikovanje rolo formacije od prave aglutinacije v reverznem delu KS namesto LISS raztopine ob testiranju uporabimo fiziološko ali citratno raztopino. Za izključitev prisotnih aloprotiteles naredimo indirektni Coombsov test, v primeru suma na protitelesa proti sestavinam reagenta pa uporabimo reagente različnih proizvajalcev.

Pri sumu na podskupino A2 si pomagamo s testiranjem vzorca z lektinom *Dolichos biflorus*, ki aglutinira samo podskupino A1, ne pa A2 oz. drugih šibkih A podskupin. Testiramo tudi z anti-H lektinom *Ulex europaeus*, saj skupina A2 vsebuje precej več substance H kot A1. Namesto lektinov lahko uporabimo komercialne reagente anti-H in anti-A1. Pri sumu na pridobljeni B (prehodno stanje, ko posameznik s KS A šibko izraža antigen B, običajno pri gastrointestinalnih okužbah) testiramo z reagentom anti-Baq.

Pri težavnih primerih se lahko poslužimo tudi genotipizacije. Problem pri molekularnih metodah (PCR SSP) je, da določitev najpogosteje zastopane skupine A1 poteka po principu izključevanja. Ko izključimo prisotnost skupine O, B in A2, kot rezultat podamo, da je najverjetnejša krvna skupina A1, žal pa ni potrjena in še vedno ostaja možnost prisotnosti redke podskupine A. Zaradi teh omejitev genetske metode niso prva izbira za opredelitev ABO diskrepanc.

## Zaključek

Pravilna določitev krvne skupine ABO je ključnega pomena za zagotovitev varnih krvnih komponent ter celic oz. tkiv v primeru transplantacije. Kljub temu se v transfuzijski medicini večkrat srečamo z diskrepantnimi rezultati, ki nam otežujejo pravilno določitev. Prva stopnja v primeru odstopajočih rezultatov je ponovitev preiskav, sledi pridobitev novega vzorca krvi ter preiskovančeve anamneze. V nadaljevanju se za uporabo različnih metod odločamo glede na vrsto odstopanja. Z napredovanjem znanosti se je nabor teh metod zelo razširil, zato je ključno

poznavanje njihovih omejitev in indikacij za uporabo. Izdelane imamo algoritme testiranja, vendar je pri razreševanju dikrepanc še vedno najpomembnejša komunikacija s kliniko, da lahko na koncu z zanesljivostjo določimo pravilno KS ABO.

## Viri

1. Olsson ML, Westman JS. ABO and Other Carbohydrate Blood Group Systems. In: Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM, editors. Technical Manual of the American Association of Blood Banks. 20th Editi. AABB; 2020. p. 297-327.
2. Klein HG, Anstee DJ. ABO, H, LE, P1PK, GLOB, I and FORS blood group systems. In: Klein HG, Anstee DJ, editors. Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine. 12th Editi. John Wiley & Sons, Ltd; 2014. p. 118-166.
3. Branch DR. Anti-A and anti-B: what are they and where do they come from? Transfusion. 2015;55 Suppl 2:S74-9.
4. Meny GM. Recognizing and resolving ABO discrepancies. Immunohematology. 2017;33(2):76-81.

## Predstavitev kliničnega primera napačne krvne skupine v informacijskem sistemu

*Tanja Hartman, Irena Bricl, Ivica Marić*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*tanja.hartman@ztm.si*

Hud neželen dogodek je kakršenkoli neželen dogodek v zvezi z zbiranjem, testiranjem, predelavo, shranjevanjem in razdeljevanjem krvi in komponent krvi, ki bi utegnil povzročiti smrt ali ogroziti življenje ter povzročiti stanje invalidnosti ali nezmožnosti za delo, ali ima za posledico hospitalizacijo ali zbolewnost ali podaljšanje hospitalizacije oziroma zbolewnosti. Neželene dogodke razdelimo na prave dogodke, ko napako spregledamo in vpliva na transfuzijo ter na skorajšnje napake (angl. near miss), ko napako pravočasno ugotovimo in preprečimo transfuzijo. Skorajšnja napaka je dogodek, pri katerem bi napaka, če je ne bi zaznali, vodila do določitve napačne krvne skupine ali izdaje nepravilne ali neustrezne komponente krvi. Med takšne primere spada napačna kri v epruveti (angl. wrong blood in tube, WBIT).

WBIT lahko razdelimo na dve skupini: v epruveti je kri napačnega bolnika, označena pa je z matičnimi podatki želenega bolnika ali pa je v epruveti kri želenega bolnika, opremljena pa je z matičnimi podatki napačnega bolnika. Tak vzorec pomeni tveganje za napačno transfuzijo ali napačno zdravljenje, ki lahko v primeru akutne hemolitične transfuzijske reakcije povzroči smrt bolnika. Zamenjavo lahko v transfuzijskem laboratoriju ugotovimo le, če ima bolnik že prej določeno krvno skupino (KS) ABO v računalniškem informacijskem sistemu, ki se razlikuje od KS, določene iz testiranega vzorca. V primeru WBIT v sklopu prenatalne diagnostike lahko pride do resnih, življenje ogrožajočih zapletov pri materi ali plodu. Ključna varnostna in preventivna mehanizma, ki preprečujeta usodne napake in zamenjave pred postopkom transfuzije sta ustrezno preverjanje bolnikove identitete in orientacijska določitev KS ob postelji bolnika (t.i. bedside test).

Novembra 2022 smo v Odseku za prenatalno diagnostiko na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino ugotovili primer WBIT, ki je bil zaradi takojšnjega ukrepanja ob zaznavi neskladja KS hitro razrešen. Dne 9.11.2023 smo prejeli naročilnico in vzorec krvi za določitev KS in indirektnega Coombsovega testa (ICT) pri nosečnici, rojeni 7.5.1996; diagnoza: grav. 10. tednov. Vzorec in naročilnica sta bila poslana iz dispanzerja za žene iz bolnišnice Postojna. Pri določitvi orientacijske KS smo določili KS A, RhD poz., Kell (K) poz. in s tem zaznali neskladje. V našem informacijskem sistemu (IS) je bila KS omenjeni nosečnici namreč že določena 26.4.2010 kot A, RhD neg., K neg. Takoj smo poklicali v dispanzer in naročili nov vzorec krvi, ki je prispel naslednji

dan. Iz obeh vzorcev krvi smo orientacijsko in strojno določili KS A, RhD poz., K poz. Iz arhiva smo v naslednjih dveh dneh pridobili originalno naročilnico iz leta 2010- takrat so iz Kliničnega oddelka (KO) za otroško onkologijo in hematologijo naročili eno enoto obsevanih koncentriranih eritrocitov (KE), ki je bila izdana; diagnoza ni bila pripisana. Iz dispanzerja za žene smo pridobili telefonsko številko gospe, ki se je strinjala s pogovorom z nami. Gospa nam je potrdila, da so navedeni kontaktni podatki na naročilnici iz leta 2010 njeni. Zanimala pa je, da je bila leta 2010 na Pediatrični kliniki, prav tako ni še nikoli prejela transfuzije. V starosti 6. let je bila na Pediatrični kliniki zaradi testiranja prisotnosti alergij. Na originalni naročilnici iz leta 2010 je bil pri točki 9. (določitev KS na ploščici pri odvzemu vzorca) ročno pripisan podatek: KS A, RhD neg., Z1107146 (19.1.2010). Na osnovi tega podatka- številka Z1107146 namreč predstavlja številko izdanega izvida, smo v našem IS izsledili, da izvid pod omenjeno številko pripada pacientki, roj. 31.7.2004, ki je KS A, RhD neg., K neg. in je v letu 2010 glede na podatke iz našega IS prejela več transfuzij KE na KO za otroško onkologijo in hematologijo. S tem smo potrdili, da je bila 26.4.2010 na KO za otroško onkologijo in hematologijo storjena huda napaka - poslali so naročilnico in vzorec krvi, ki je bil od zelene pacientke, vendar opremljen z matičnimi podatki druge pacientke. Zaradi varstva o varovanju podatkov ne smemo razkriti imen in priimkov pacientk, lahko pa razkrijemo, da imata zgoraj omenjeni pacientki enako ime, priimka sta zelo podobna- gre zgolj za zamenjavo črk jn/nj na določenem mestu v priimku. Po ugotovitvi napake smo takoj sprejeli ustrezne korektivne ukrepe: podali smo prijavo hudega neželenega dogodka Službi za hemovigilanco, obvestili smo pristojni bolnišnični transfuzijski odbor, predstojnici KO za otroško onkologijo in hematologijo smo poslali dopis, v katerem smo priporočili večjo pozornost pri predtransfuzijski identifikaciji, v našem IS smo naredili blokado pacientke, pri kateri je bila napačno določena KS v letu 2010 in odprli novo pacientko s pravilno določeno KS, pri pacientki, roj. 31.7.2004, pa smo v naš IS zabeležili podatek, da je leta 2010 prejela enoto KE pod napačnimi matičnimi podatki.

V letu 2021 je bilo v Sloveniji 1113 skorajšnjih napak. Med njimi je bilo največ napačno izpolnjenih naročilnic za kri in krvne komponente ter transfuzijske preiskave (561) in napačnih orientacijskih določitev KS ABO na bolnišničnih oddelkih (232). Bilo pa je tudi 19 primerov WBIT, kar je zelo huda napaka. Primerjave števila skorajšnjih napak v zadnjih letih kažejo, da se kljub izobraževanju vseh vpletenih v transfuzijo krvi njihovo število žal ni bistveno zmanjšalo. Povprečje WBIT v Sloveniji v deset-letnem obdobju (od 2012 do 2021) znaša 18,3 (podatki so pridobljeni iz hemovigilancijskih poročil za posamezna leta in so prikazani v Tabeli 1). Ti podatki so najverjetneje podcenjeni, saj primerov WBIT ne moremo zaznati, v kolikor nimamo predhodno določene KS v našem IS.

Leto	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Število napačnih vzorcev krvi v epruveti (WBIT)	19	10	18	30	23	16	12	13	23	19

Tabela 1: Število napačnih vzorcev krvi v epruveti (WBIT) glede na posamezno leto v Sloveniji

Na vseh izobraževanjih zato poudarjamo pomen pravilnega odvzema krvi in identifikacije bolnika za transfuzijske preiskave ter izjemen pomen obstojnega testa. Rešitev vidimo v določitvi KS pacientov iz dveh različnih vzorcev krvi. Ključno je izobraževanje osebja, da dvakratni odzem vzorca sprejme in razume kot standard bolj kakovostne obravnave bolnika. Dokazano je bilo, da tak način ne poveča dela v laboratoriju ali izdaje O RhD negativne krvi, hkrati pa zmanjša verjetnost napačne transfuzije zaradi napačne določitve KS in s tem pomembno pripomore k povečanju varnosti. Enaka študija je tudi dokazala, da zgolj izobraževanje osebja ne pripomore k statističnemu zmanjšanju števila WBIT, zato si želimo, da bi v Sloveniji v prihodnosti postala standardna praksa določanja KS pacientov iz dveh različnih vzorcev krvi.

## Viri

1. Zakon o preskrbi s krvjo 2006. Ur l RS 104/06
2. Potočnik M., Bricl I. Hemovigilanca: neželene reakcije ob transfuziji. V Ljubljani: Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino; 2012. p. 24.
3. Bolton-Maggs P, Wood EM, Wiersum-Osselton JC. Wrong blood in tube – potential for serious outcomes: can it be prevented? *British journal of haematology*; 2015. [cited 2023 Mar 2]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bjh.13137>.
4. Dolinar U. Bricl I. Napačna kri v epruveti: spodrseljaj ali nevarnost za bolnika. *Zdravniški vestnik*; 2019. [cited 2023 Mar 2]. Available from: <https://vestnik.szd.si/index.php/ZdravVest/article/view/2870>.
5. Pravilnik o transfuzijskih preiskavah in postopkih ob transfuziji 2007. Ur l RS 9/07
6. Marič I. Hemovigilanca. *Isis*; 2023. [cited 2023 Mar 2]. Available from: <https://online.pubhtml5.com/agma/shzi/#p=41>
7. Thomas W, Davies J, Asamoah A, Scott-Molloy C, Sansom V, Kerr J. Two samples for blood transfusion: single centre experience. *Transfus Med*. 2014 aug; 24(4):209–12.



## CELIČNE TERAPIJE (ZTMS)

Deplecija limfocitov T alfa/beta (+/-CD19) v presadku krvotvornih matičnih celic

*Primož Požanel*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*primoz.pozanel@ztm.si*

### Uvod

Pri skladni alogenski transplantaciji krvotvornih matičnih celic (KMC) zasledujemo zelo visoko ujemanje v pomembnih antigenih HLA med bolnikom in darovalcem. Pri haploidentični transplantaciji je polovica antigenov sistema HLA neskladnih s prejemnikom. V izogib uničujoči bolezni presadka proti gostitelju (angl.GVHD) so poizkušali in uveljavili različne pristope *in vivo* ter *ex vivo* za zmanjšanje bremena limfocitov T.

### Preprečevanje GVHD, ohranitev imunske sposobnosti presadka

V patogenezi GVHD imajo glavno vlogo limfociti T in sicer citotoksični limfociti T, zato so v izogib hudemu GVHD najprej poskušali s selektivnim odstranjevanjem teh celic. Izkazalo se je, da ima presadek KMC, ki so mu *ex vivo* odstranili vse limfocite T (CD3+) ali pa samo citotoksične limfocite (CD8+), več pomanjkljivosti. Bolniki, ki so prejeli tako obdelan presadek, so imeli po transplantaciji pogostejše ponovitve bolezni in pogostejše okužbe zaradi prenizkega odmerka celic T ter posledične počasne rekonstitucije celične imunosti.

Velik napredek je prinesla metoda deplecije celic T *in vivo* z uporabo ciklofosfamida, ki naj bi v tej situaciji deloval preko naslednjih mehanizmov:

- 1) selektivna izločitev aloreaktivnih celic T
- 2) klonska delecija aloreaktivnih prekurzorjev celic T v timusu
- 3) indukcija regulatornih celic T

Vzporedno s tem so se pojavili pristopi, ki so uporabljali princip imunoselekcije oziroma deplecije *ex vivo*. Tarčne celice v presadku so limfociti T alfa/beta, ki predstavljajo več kot 90% vseh

limfocitov T. Limfociti T alfa/beta so ključne celice v patologiji akutnega GVHD, še posebej kmalu po alogenski transplantaciji, ko je vnetje v prejemniku posledica kondicioniranja.

Po depleciji alfa/beta v presadku ostanejo limfociti gama/delta, ki lahko v času regeneracije oziroma aplazije nadomestijo odsotnost večje populacije limfocitov T. Gama/delta limfociti so majhna populacija limfocitov v periferni krvi, ki so sposobni hitrega citotoksičnega protitumorskega odziva ter sproščanja vnetnih citokinov kot sta IFN- $\gamma$  ali IL-17. Pomembno vlogo imajo kot prva linija obrambe proti okužbam v različnih organih (koža, pljuča, črevo). V periferni krvi se celice gama/delta zelo hitro pomnožujejo v odziv na različne povzročitelje (citomegalovirus, plazmodij), sproščajo citokine in delujejo citotoksično.

### **Mehanizem deplecije alfa/beta limfocitov T (+/-CD19) iz presadka krvotvornih matičnih celic**

Limfocite T alfa/beta odstranimo iz presadka krvotvornih matičnih celic na aparatu, ki omogoča imunomagnetno selekcijo. Tarčne celice (limfociti T alfa/beta) označimo s protitelesi, usmerjenimi proti alfa in beta verigi receptorja celic T. Dodamo še sekundarna protitelesa, ki so usmerjena proti primarnim in imajo vezane imunomagnetne mikrokroglice. Tako označene celice spustimo skozi magnetno polje. Celice T alfa/beta, ki imajo vezana primarna in sekundarna protitelesa, v magnetnem polju obstanejo (pozitivna frakcija), vse ostale celice (CD34+, celice NK in limfociti gama/delta) pa so v negativni frakciji, ki jo zberemo v vrečki za končni produkt. S tem postopkom iz presadka krvotvornih matičnih celic odstranimo večji del celic T alfa/beta ter ohranimo pomemben del celic CD34+, celice NK ter celice T gama/delta. Tako obdelan presadek ima pomembno zmanjšan delež celic, ki so vključene v patogenezo GVHD, obenem pa ohranjene krvotvorne matične celice ter imunske celice, ki v času regeneracije celic iz presadka zagotavljajo obrambo pred mikroorganizmi in protitumorsko aktivnost. Pomembna populacija celic, ki ostane v presadku, so celice NK. Le-te imajo pomembno vlogo, ker delujejo protitumorsko in s tem preprečujejo ponovitev krvne bolezni. Pri sodobnejših napravah je omogočena tudi hkratna deplecija limfocitov B (CD19), kar zmanjšuje tveganje za potransplantacijsko limfoproliferativno bolezen.

### **Izkušnje ZTM**

Na ZTM smo leta 2022 uspešno opravili 2 validaciji postopka deplecije alfa/beta ter limfocitov B (CD19). V vzorcu levkocitnega pripravka zdravega darovalca (angl. buffy coat) smo določili število celic CD45+, limfocitov T alfa/beta, limfocitov T gama/delta, limfocitov B in viabilnost celic CD45+. Sledila je deplecija alfa/beta in nato smo prešteli celice v končnem produktu. Dosegli smo znižanje

števila limfocitov T alfa/beta za 4,32 in 5,14 logaritmov (cilj je bil med 3,8 in 5,5), limfocitov B za 2,8 in 4,37 logaritmov, hkrati pa smo ohranili slabo polovico vseh limfocitov gama/delta iz začetnega vzorca. Viabilnost levkocitov v končnem pripravku je bila 96% in 97%. Cilje validacije, ki so primerljivi s tujimi študijami, smo dosegli, kar pomeni, da smo ustrezno zmanjšali vsebnost limfocitov T alfa/beta, limfocitov B ter ohranili ustrezno raven limfocitov T gama/delta. Naslednji korak je priprava osiromašenega presadka (deplecija alfa/beta in CD19) za klinično uporabo.

## Klinične študije

Deplecija alfa/beta z ali brez deplecije celic CD19 (limfociti B) je v zadnjih letih z razvojem avtomatiziranih platform postala zanesljiv postopek in daje predvidljive rezultate. Kljub temu da z njo bistveno zmanjšamo vsebnost limfocitov T alfa/beta, je izplen celic CD34+ v povprečju visok in je med 70 in 80%. Izplen celic gama/delta je bolj variabilen in je v povprečju med 40 in 80%. Glavni razlog za uporabo deplecije alfa/beta je haploidentična transplantacija, drugi razlogi so poživitvena »booster« transplantacija zaradi primarne odpovedi ali slabo delujočega presadka v kontekstu haploidentične, sorodne in nesorodne skladne transplantacije. Pojavnost akutnega GVHD nižje stopnje (gradus I in II) je bil v različnih študijah v razponu od 10 do 25%, akutni GVHD gradusa III in IV se je pojavljal redko. Z osiromašenimi presadki so do sedaj zdravili tako pediatrične kot odrasle bolnike z malignimi (AML, ALL, MDS) in nemalignimi boleznimi (adrenolevkodistrofija, Fanconijeva anemija, SAA, WAS). Neposredne prospektivne klinične primerjave med haploidentičnimi transplantacijami, pri katerih so izvajali *in vivo* deplecijo (post Cy) ter *ex vivo* deplecijo (deplecija alfa/beta) še ni bilo. Retrospektivni podatki pa kažejo, da je preživetje obeh skupin pediatričnih bolnikov, ki sta prejeli ciklofosamid po transplantaciji ali *ex vivo* procesiran presadek, primerljivo.

## Zaključek

Deplecija alfa/beta je zmogljiv in zanesljiv postopek, ki omogoča predvidljivo (odmerki vseh ključnih populacij celic so pred transplantacijo znani) in varno obdelavo presadka krvotvornih matičnih celic *ex vivo* za namen haploidentične transplantacije. V zadnjem času prihaja vse več novih kliničnih indikacij in poizkusov, npr. obdelava donorskih limfocitov, obdelava skladnih presadkov KMC in poživitvenih »booster« presadkov, ki širijo aplikativnost *ex vivo* deplecije limfocitov alfa/beta.

## Viri

1. Nunes NS, Kanakry CG. Mechanisms of Graft-versus-Host Disease Prevention by Post-transplantation Cyclophosphamide: An Evolving Understanding *Front Immunol.* 2019; 10: 2668. Published online 2019 Nov 29.
2. Ribot JC, Lopes N, Silva-Santos B.  $\gamma\delta$  T cells in tissue physiology and surveillance Julie C. *Nature Reviews Immunology* volume 21, pages 221–232 (2021).
3. Bethge W.A., Eyrich, M., Mielke, S. et al. Results of a multicenter phase I/II trial of TCR $\alpha\beta$  and CD19-depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation for adult and pediatric patients. *Bone Marrow Transplant* 57, 423–430 (2022).
4. de Witte MA, Janssen A, Nijssen K et al.  $\alpha\beta$  T-cell graft depletion for allogeneic HSCT in adults with hematological malignancies. *Blood Adv* 2021; 5 (1): 240–249.
5. Merli P, Pagliara D, Galaverna F e tal.. TCR $\alpha\beta$ /CD19 depleted HSCT from an HLA-haploidentical relative to treat children with different nonmalignant disorders. *Blood Adv.* 2022 Jan 11;6(1):281-292.
6. Li Pira G., Malaspina D, Girolami E et al. Selective depletion of  $\alpha\beta$  T cells and B cells for human leukocyte antigen–haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. A three-year follow-up of procedure efficiency. *Biol Blood Marrow Transplant.* of blood and marrow transplantation, Volume 22, Issue 11, 2016 Nov;22(11):2056-2064
7. Sahasrabudhe K, Otto M, Hematti P et al TCR  $\alpha\beta$ + /CD19+ cell depletion in haploidentical hematopoietic allogeneic stem cell transplantation: a review of current data. *Leuk Lymphoma.* 2019 Mar;60(3):598-609.
8. Haastrup E, Ifversen MRS, Heilmann C e tal. Depletion of  $\alpha\beta$ + T and B cells using the CliniMACS Prodigy: Results of 10 graft-processing procedures from haploidentical donors. *Transfus Med Hemother.* 2019 Dec;46(6):446-449.
9. Kleinschmidt K, Lv M, Yanir A et al. T-cell-replete versus ex vivo T-cell-depleted haploidentical haematopoietic stem cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukaemia and other haematological malignancies. *Front Pediatr.* 2021 Dec 24;9:794541.

## Pridobivanje JACIE akreditacije na Centru za afereze Oddelka za terapevtske storitve ZTM

*Ana Milojković*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*Ana.milojkovic@ztm.si*

Presaditev krvotvornih matičnih celic je osrednji in najbolj zahtevni del zdravljenja najbolj neugodnih hematoloških, onkoloških-in nekaterih dednih bolezni.. Kompleksnost samega postopka presaditve, potreba po multidisciplinarnem pristopu in medsebojna povezanost vseh udeleženih (registri darovalcev, laboratoriji, klinični oddelki, odvzemni centri, laboratoriji za obdelavo in shranjevanje celic se v marsičem razlikuje od drugih področij v medicini in dodaja novo dimenzijo tradicionalnemu pristopu zdravljenja. Zato je bila že v 90-tih letih prejšnjega stoletja prepoznana potreba po robustnem sistemu, ki bi zagotavljal kakovost in varnost, bil v skladu z veljavno zakonodajo ter obenem upošteval biološko variabilnost celičnih terapij.

Na pobudo organizacije »European Group for Blood and Marrow Transplantation« (EBMT) in evropskega dela Mednarodnega Združenja za Celične terapije (International Society for Cellular Therapy; ISCT) je bil z namenom nadzora in akreditacije za področje presajanja krvotvornih matičnih celic leta 1998 ustanovljen JACIE (Joint Accreditation Committee – ISCT & EBMT). Pri snovanju koncepta JACIE je bila zgled organizacija »Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy« (FACT), ki je bila dve leti pred tem ustanovljena v ZDA.

Že od same ustanovitve JACIE in FACT tesno sodelujeta pri postavljanju in vzdrževanju enakih meril mednarodno sprejetih standardov, ki pokrivajo vse tri glavne stebre transplantacijske dejavnosti, in sicer klinični del, zbiranje ter procesiranje celic. Transplantacijska dejavnost je perspektivno in hitro razvijajoče se področje in poleg presaditev krvotvornih matičnih celic vključuje tudi druge celične, imunske ter citotoksične terapije. Standardi se posodablajo in širijo skladno z razvojem področja in izhajajo vsake tri leta. Trenutno je v veljavi 8. izdaja. Oblikovanje vsake nove verzije standardov temelji na transparentnem in strukturiranem delu, ki upošteva mnenje mednarodnih ekspertov kot tudi širše javnosti.

Proces akreditacije je razdeljen v tri faze. Prva faza zajema pripravo in pošiljanje relevantne dokumentacije presojevalcu na vpogled. V drugi fazi oziroma tekom same presoje presojevalec fizično pregleda prostore, postopke, opravi pogovore z osebjem ter pregleda dodatno dokumentacijo. Presojevalci podajo svoje mnenje komiteju (komisija?) JACIE, ki pregleda poročilo ter določi morebitne dodatne korake. V tretji fazi presojeni center pošlje dokazila o odpravljenih neskladjih ter dodatnih uvedenih postopkih, ki jih je zahteval presojevalec oziroma JACIE komite. Po pridobitvi akreditaciji mora center nadaljevati z dobro prakso, ki jo predpisuje standard, če želi uspešno opraviti reakreditacijo, ki se ponavlja vsake 4 leta.

### **Zakaj se sploh odločiti za akreditacijo JACIE? Kakšno dodano vrednost nam je prinesla?**

Naša odločitev za pridobitev akreditacije JACIE temelji na želji po konstantnem napredku in spodbujanju visoke kvalitete oskrbe pacientov in laboratorijskih storitev v procesu zbiranja procesiranja celic ter transplantacij KMC. JACIE standard združuje in ureja vse omenjene stebre transplantacijske dejavnosti, kar je bolj kot ne izjema v primerjavi z drugimi regulativami, ki so po pravilu bolj ozko usmerjene na določeno področje. Nenazadnje JACIE omogoča tudi mednarodno prepoznavnost in primerljivost.

Na Centru za afereze (CA) smo s pripravami začeli leta 2016. Priznanje same dejavnosti s strani nacionalnih inštitucij ter vpeljan sistem kakovosti je osnova, brez katere sam proces akreditacije ne bi bil mogoč. Prav tako je bilo ključnega pomena poznavanje celotnega transplantacijskega programa ter dobra medsebojna komunikacija vseh udeleženi. Prva faza akreditacije je bila najdaljša in najbolj zahtevna. Na začetku smo določili osebje, ki bo sodelovalo pri pridobivanju akreditacije JACIE, razdelili zadolžitve, in definirali skupne dejavnosti, poti komuniciranja ter določili časovnico. Osnovni dokument presoje je predstavljal t.i. »Inspection check list« v obliki Excelove tabele, ki je razdeljena na več področij in sicer: »B« klinični del, »C« zbiranje (afereze), »CM« zbiranje (kostni mozeg), »D« procesiranje. Vsako od navedenih področij vsebuje tudi poglavje »QM« (quality management - kakovost) ter poglavje o darovalcih. Posebej je obdelano tudi označevanje ter transport produktov. Center, ki je v procesu pridobivanja akreditacije, na t.i. »Inspection check listi« sam označi ali je dotično področje v skladu z zahtevami standarda ali ne in za vsako trditev predloži ustrezno dokumentacijo v obliki SOP-jev, prilog, dokumentov, pogodb... Tekom dela se je pokazalo, da je potrebno nekatere SOP-je dopolniti, določene pa napisati na novo.

Največ pozornosti je bilo namenjene naslednjim področjem:

- Komunikacija med vsemi udeleženi v procesu transplantacije in njihove aktivnosti (določanje indikacije ter naročanje odvzema KMC, pregled darovalca/bolnika, laboratorijsko testiranje (virusni markerji, krvna skupina), sproščanje darovalca /bolnika, način pošiljanja povratne informacije, naročanje pripravkov, infuzija ..)
- Določanje kriterijev sprejemljivosti bolnika/darovalca za odzem, upoštevanje pridruženih bolezni, terapije, žilnega pristopa, starosti, hemograma pred odvzemom (hemoglobin, trombociti, elektroliti, testi hemostaze v določenih primerih), določanje ustreznega števila CD34+ celic za začetek postopka.
- Ustrezno prilagajanje parametrov zbiranja glede na zgoraj navedeno (volumen predelane krvi, antikoagulans, potreba po izpolnjevanju stroja s koncentriranimi eritrociti za pediatrično populacijo, nadomeščanje kalcija v infuziji...)
- Definiranje neželenih učinkov ter način ukrepanja
- Kriteriji sprejemljivosti pripravka ter poti v primeru odstopanj
- Izredno sproščanje (darovalec oziroma pripravek, ki ne ustreza vnaprej določenim kriterijem, vendar v dani situaciji predstavlja najboljšo terapevtsko opcijo za bolnika)
- Ukrepanje v primeru pozitivnih mikrobioloških kontrol
- Izdaja, shranjevanje, transport pripravka
- Označevanje produktov (avtologni, alogenski, biološko tveganje)

S kritičnim vpogledom v svoje delo smo v nekem trenutku prišli do zaključka, da ima center za kriobiologijo (CK) bolj dorečene SOP-je in da je pri samem delu manj spremenljivk, ki jih je potrebno upoštevati kot če je v proces vpleten bolnik oz darovalec. Glede na to, da so z vsako novo izdajo standarda kriteriji bolj strogi in določene zahteve, ki so bile sprva opredeljene le kot priporočilo, postanejo obvezne, je CK nadaljeval proces akreditacije samostojno in ga uspešno zaključil maja 2020.

Na CA smo vso potrebno dokumentacijo oddali decembra 2020. Ker so bile presoje v času pandemije SARS-CoV-2 ustavljene, smo čakali na nov poziv ter februarja 2022 poslali posodobljeno dokumentacijo. Presoja smo dejansko opravili 25. in 26. maja 2022. Sama presoja je bila zahtevna, vendar je bila opravljena s strani mednarodnih strokovnjakov, ki se vsakodnevno ukvarjajo z delom, ki ga presojujejo in je potekala v spoštljivem vzdušju s smiselnimi ter dobronamernimi vsebinskimi komentarji.

Po dvodnevem obisku kritičnih neskladnosti ni bilo ugotovljenih. Po pridobitvi končnega poročila septembra 2022 smo začeli s pripravo na odgovor. Komentarji so se nanašali predvsem na

dokumentiranje izbire darovalcev (potrditev, da se izvaja test za nosečnost pri darovalkah pred stimulacijo, evalvacija glede hemoglobinopatij, spremljanje donorjev po zbiranju, kriteriji sprejemljivosti mladoletnih darovalcev...). V sodelovanju s kliničnimi oddelki smo vse potrebno ustrezno dokumentirali ter februarja 2023 poslali odgovor na JACIE. V kratkem smo dobili sporočilo JACIE komiteja, ki je uradno potrdilo, da ustrezamo standardu JACIE za področje aferez, s čimer smo za to področje pridobili i akreditacijo.

Zavedamo se, da je to šele začetek in da je za vzdrževanje akreditacije potrebnega veliko dela in predanosti. Pridobitev akreditacije JACIE je vsekakor dobra popotnica za prihodnost, ker je JACIE v določenih državah EU že zakonsko obvezna, prav tako pa jo določene klinične študije zahtevajo kot pogoj za sodelovanje. To se predvsem nanaša na študije, ki se ukvarjajo z naprednimi celičnimi terapijami, kjer se zahteva visok nivo kvalitete produkta, sledljivosti ter klinične obravnave bolnika po aplikaciji celičnega pripravka.

Veliko zadovoljstvo nam predstavlja dejstvo, da je naše delo po mednarodnih merilih prepoznano kot odlično ter da se lahko postavimo ob bok najboljšim centrom v Evropi, ki izvajajo afereze in procesiranje celic.

## Viri

1. JA Snowden, E McGrath, RF Duarte, R Saccardi, K Orchard, N Worel et. al. JACIE accreditation for blood and marrow transplantation: past, present and future directions of an international model for healthcare quality improvement. *Bone Marrow Transplant.* 2017; 52: 1367-1371.
2. S Marmor, JW Begun, J Abraham, BA Virnig. The impact of center accreditation on hematopoietic cell transplantation (HCT). *Bone Marrow Transplant.* 2015; 50:87-94.
3. Magri, M., Martín, R.E. (2021). The Accreditation Process. In: Aljurf, M., Snowden, J.A., Hayden, P., Orchard, K.H., McGrath, E. (eds) *Quality Management and Accreditation in Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapy.* Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-64492-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-030-64492-5_14)



## Register darovalcev granulocitov

*Katja Petruša*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*katja.petrusa@ztm.si*

Transfuzije granulocitnih pripravkov so v uporabi za zdravljenje in preprečevanje življenje ogrožujočih okužb pri nevtropeničnih pacientih že več kot 40 let, kljub stalno prisotnim pomislekom glede njihove učinkovitosti. Indikacije za zdravljenje s transfuzijami granulocitnih pripravkov so lahko terapevtske ali profilaktične. Terapevtske transfuzije so indicirane pri zdravljenju okužb bolnikov s hudo nevtropenijo ( $<0,5 \times 10^9/l$ ), ki se ne odzivajo na protimikrobna zdravila, profilaktične transfuzije pa so indicirane za sekundarno profilakso pri bolnikih, ki so imeli hude bakterijske ali glivične okužbe in potrebujejo nadaljevanje citostatskega zdravljenja oz. presaditev krvotvornih matičnih celic.

Zdravljenje s pripravki granulocitov izvajajo hematologi ali specialisti druge stroke v sodelovanju s hematologi. Zbiranje granulocitov izvajamo le na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, pri iskanju primernih darovalcev pa sodelujejo vse transfuzijske ustanove širom Slovenije. Za darovanje granulocitov so primerne zdrave osebe, stare od 18 do 65 let, ki izpolnjujejo splošna merila za darovanje krvi in krvnih komponent. Pri pregledu darovalcev moramo biti posebej pozorni na morebitna zdravstvena stanja, ki predstavljajo kontraindikacijo za prejem zdravil, ki jih darovalci kot stimulacijo prejmejo dan pred samim odvzemom. Izbrane darovalce v predpisanem obsegu testiramo na prisotnost označevalcev bolezni, ki se prenašajo s krvjo (hepatitis B, hepatitis C, sifilis, HIV). Glede na »citomegalovirusni (CMV) status« bolnika, lahko vse darovalce dodatno testiramo tudi na CMV in zagotovimo ustrezne granulocitne pripravke. Zaradi sorazmerno visokega deleža eritrocitov v granulocitnih pripravkih morajo biti darovalci ABO in RhD skladni s prejemnikom, pred izdajo pripravka pa je potrebno opraviti tudi navzkrižni preizkus. Pred izbiro darovalce vedno informiramo o vseh vidikih darovanja granulocitov in možnih zapletih. Pred postopkom mora vsak darovalec podpisati izjavo o poučenosti in pristane na odvzem.

V literaturi je moč zaslediti, da se prakse glede načina priprave granulocitnih pripravkov in izbire dajalcev med državami, ponekod pa tudi znotraj iste države, razlikujejo. Večina raziskav si je

enotna, da je učinek transfuzije granulocitov pogojen s prejeto dozo granulocitov. Granulocitne pripravke lahko pridobimo na 2 načina, in sicer z zlitjem levkocitno-trombocitne plasti, t.i. buffy coatov, pripravljenih iz polne krvi več darovalcev iste krvne skupine ali z afereznim postopkom iz krvi enega dajalca. Za učinkovitejše zbiranje granulocitov s postopkom afereze je potrebno darovalca stimulirati z zdravili, kortikosteroidi in/ali granulocitne kolonije stimulirajočim faktorjem (G-CSF), s čimer vplivamo na dozorevanje ter izplavljanje granulocitov iz zalog v kostnem mozgu v periferno kri, v krvnem obtoku pa na prehod granulocitov iz marginalnega poola v centralni. Zaradi boljšega izkoristka zbiranja je potrebno med afereznim postopkom uporabljati sedimentirajoče sredstvo, ki vpliva na boljše ločevanje plasti nevtrofilnih granulocitov od eritrocitov. Z granuloferezo stimuliranih darovalcev zberemo pripravke granulocitov, ki imajo v primerjavi z drugimi načini priprave največ nevtrofilnih granulocitov z najmanjšim volumnom in številom preostalih krvnih celic, zato se za ta način zbiranja odločamo tudi pri nas. Pripravke granulocitov je priporočljivo transfundirati čim hitreje po postopku zbiranja, shranjevanje pa je omejeno na največ 24 ur od odvzema na sobni temperaturi (22+/- 2 st. C) brez nenehnega mešanja. Neposredno pred izdajo je potrebno granulocitni pripravek obsevati, ker so v zbranem pripravku viabilni limfociti, ki lahko povzročijo s transfuzijo povezano reakcijo presadka proti gostitelju.

Na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino iskanje možnih darovalcev granulocitov poteka preko vnaprej določenega koordinatorja, ki je najpogosteje pacientov sorodnik ali dobri znanec. Le-ta skrbi za zadostno število razpoložljivih darovalcev, dostavo zdravil za stimulacijo darovalca pred odvzemom in pomaga pri koordinaciji in komunikaciji z darovalci. Potencialni darovalci, ki jih poišče koordinator, se za prvi pregled in oceno primernosti za darovanje granulocitov po predhodnem dogovoru zglasijo v za njih najbližji transfuzijski ustanovi. Večer pred odvzemom darovalec prejme G-CSF (480 mcg sc.) in tableto metilprednizolona (48 mg) zaradi boljšega izplena zbiranja. Zdravila za stimulacijo darovalcu priskrbi koordinator, ki le-ta prejme na Kliničnem oddelku za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Transfuziolog se za aplikacijo G-CSF dogovori z osebjem v za darovalca najbližji zdravstveni ustanovi. Odvzem granulocitov izvedemo z afereznim postopkom. Med granuloferezo odvzeti krvi dodajamo sedimentacijsko sredstvo - hidroksetilni škrob (HES). Med darovanjem granulocitov lahko nastanejo neželeni učinki, ki so povezani z dajanjem zdravil ali s samim afereznim postopkom, vendar so praviloma blagi in darovalcev navadno ne odvrnejo od ponovnih darovanj. Isti darovalec lahko daruje granulocite do trikrat v presledku 5 do 10 dni med posameznima postopkoma.

Vloga koordinatorja prinaša veliko breme in odgovornost in je za marsikaterega svojca v že tako stresni situaciji zelo zahtevna. Veliko ljudi ima z iskanjem primernih darovalcev težave, nekateri pa imajo težave bolj z obvladovanjem prevelikega števila ljudi, ki bi radi priskočili na pomoč. Koordinacija in številna usklajevanja predstavljajo svojevrsten izziv tudi za nas. Praviloma je pregledov potencialnih darovalcev, ki terjajo čas in so nenazadnje povezani tudi s stroški, veliko več kot je dejansko primernih kandidatov za darovanje granulocitov. V izogib zgoraj opisanim težavam v prihodnosti načrtujemo vzpostavitev registra darovalcev granulocitov. Vanj bi po predhodni seznanitvi z darovanjem granulocitov in podpisani privolitvi vključili krvodajalce, ki so v preteklosti vsaj dvakrat uspešno darovali polno kri, trombocite ali plazmo. V register bi vključili omejeno število krvodajalcev vseh krvnih skupin ABO in RhD in ga sproti posodabljali oz. dopolnjevali. Ob izkazani indikaciji za prejemanje transfuzij granulocitov bi na tak način lahko hitreje vzpostavili in organizirali zbiranje granulocitov, hkrati pa razbremenili svojce pacientov. Register darovalcev granulocitov bi pomenil velik kakovostni in logistični preskok na področju zdravljenja življenja ogrožujočih okužb ob hudi nevtropeniji.

## Viri

1. Cukjati M, Domanović D, Zver S. Pripravki granulocitov in priporočila za njihovo uporabo. *Zdrav. Vestn.* 2011;80(6):439-50.
2. Morton S, Stanworth S, Lozano M, Harrison SJ, Hong FS, Dennington P, et al. Vox Sanguinis International Forum on provision of granulocytes for transfusion and their clinical use. *Vox Sang.* 2017;112(7):48-68.
3. Gea Banacloche. Granulocyte transfusions: a concise review for practitioners. *Cytotherapy.* 2017;19(11): 1256-69.
4. Axdorph N, Sollen Nilsson A, Lundahl J. Eighteen years experience of granulocyte donations- acceptable donor safety? *J Clin Apher.* 2015;30(5):265-72.

## SISTEM KAKOVOSTI (ZTMS)

### Sistem vodenja kakovosti na Zavodu RS za transfuzijsko medicino

Apolonija Uran

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

apolonija.uran@ztm.si

Zavod RS za transfuzijsko medicino (ZTM) je javni zdravstveni zavod, ki opravlja dejavnosti preskrbe s krvjo, preskrbe s tkivi in celicami, diagnostično dejavnost ter preskrbo z zdravili iz krvi. Izvajanje različnih dejavnosti je podvrženo zahtevam različne zakonodaje in podzakonskih aktov. Skupna zahteva vseh je zahteva po vzpostavljenem in vzdrževanem sistemu vodenja kakovosti (SVK):

Zakoni in podzakonski akti	Zahteva
Zakon o preskrbi s krvjo (Ur.l. RS 104/06) in Pravilnik o standardih in tehničnih zahtevah sistema kakovosti za transfuzijsko dejavnost (Ur.l. RS 09/07)	člen IV. Transfuzijski zavod ali transfuzijski center vzpostavi in vzdržuje sistem kakovosti, ki temelji na načelih dobrih praks
Pravilnik o pogojih, ki ga morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine (Ur.l.RS 64/04)	člen 7. Medicinski laboratorij mora vzpostaviti in vzdrževati sistem zagotavljanja kakovosti,...
Zakon o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje (Ur.l.RS 61/07)	člen 21. Ustanova za tkiva in celice ima in posodablja sistem kakovosti, ki temelji na načelih dobrih praks.
Zakon o zdravilih (Ur.l.RS 17/14, 66/19) in podzakonski akti	člen 6. Dobra proizvodna praksa je sistem kakovosti, ki zagotavlja dosledno proizvodnjo in kontrolo zdravil in učinkovin v skladu s standardi kakovosti.... Dobra distribucijska praksa je sistem kakovosti, ki se nanaša na organizacijo, izvajanje in nadzor shranjevanja izdelkov....

Zahtevo po vzpostavljenem SVK prinaša tudi nov predlog Uredbe evropskega parlamenta in sveta o standardih kakovosti in varnosti za snovi človeškega izvora (SČI), namenjene za uporabo na ljudeh, ter o razveljavitvi direktiv 2002/98/ES in 2004/23/ES (*člen 50. Sistem vodenja kakovosti (Ustanove za SČI vzpostavijo, vzdržujejo in po potrebi posodabljujejo SVK...)*). Tudi Nacionalna strategija kakovosti in varnosti v zdravstvu (2023-2031) določa zahteve in aktivnosti v zvezi s kakovostjo in varnostjo v zdravstvu.

Sistem pomeni skupino medsebojno odvisnih procesov in ljudi, ki skupaj opravljajo skupno nalogo. SVK pa je formaliziran sistem, s katerim se dokumentirajo struktura, odgovornosti in postopki, potrebni za zagotovitev učinkovitega vodenja kakovosti.

Načela vodenja kakovosti so osredotočenost na odjemalce, voditeljstvo, angažiranost ljudi, procesni pristop, izboljševanje, odločanje na podlagi dejstev in upravljanje odnosov.

ZTM je že leta 2004 vzpostavil SVK v skladu z zahtevami standarda ISO 9001. Glavno vlogo pri vzpostavitvi SVK je imela Služba vodenja sistema kakovosti. Seveda pa brez podpore takratnega vodstva ter z njegovo zavezanostjo in razumevanjem kakovosti, cilja ne bi dosegli. Odločitev, da se v SVK vključi celoten ZTM, je bila pravilna. Naš prvi korak pri uvajanju SVK je bilo izobraževanje in usposabljanje vseh zaposlenih s področja SVK, kajti bistveno je, da sistem razumejo, sprejmejo in v njem sodelujejo vsi zaposleni. Na vsakem oddelku/centru smo imenovali osebe-zastopnike za kakovost, ki so odgovorni za vsakodnevno izvajanje nalog s področja SVK. Za njih smo organizirali posebne delavnice, na katerih smo jim predstavili dokumentacijo SVK in postopke kvalifikacije opreme. Sami so morali pripraviti navodilo za pripravo turške kave. To je bil naš prvi primer standardnega operativnega postopka (SOP).

Sledila je priprava obširne dokumentacije SVK (Poslovnik kakovosti, SOP-ji, obrazci) ter vpeljava organizacijskih postopkov za pritožbe, neskladnosti, izvajanje vodstvenega pregleda, notranje presoje, kvalifikacijo opreme ter validacijo procesa.

Področje SVK smo vključili v uvajalne programe za novo zaposlene in v programe izobraževanj, ki jih izvajamo na ZTM za zunanje udeležence.

SVK zahteva aktivno vključenost vodstva. Vodstvo je tisto, ki zagotavlja razpoložljivost virov, določi politiko kakovosti in cilje kakovosti, ki morajo biti usklajeni s strategijo, spodbuja izboljševanje ter izvaja redne vodstvene preglede. Vodstvo ZTM izvaja redne letne preglede, na katerih ocenimo ustreznost in uspešnost SVK ter podamo možnosti za izboljšave.

Z zastopniki za kakovost, katerih število je v teh letih naraslo na 24, se redno sestajamo in predajamo novosti, prav tako se sestajamo tudi z nosilci procesov in vodstvom. Nenehno

izobraževanje je pomemben del vzdrževanja SVK. Vsak zaposleni igra pomembno vlogo pri razvoju in vzdrževanju sistema.

SVK izboljšujemo tudi s spremljanjem zadovoljstva odjemalcev (ankete), z beleženjem in obravnavo njihovih pritožb, z merjenjem procesov in beleženjem neskladnosti. Pobude za izboljšave SVK so dobrodošle tudi s strani zaposlenih.

Dokumentacija SVK je že od leta 2010 računalniško obvladovana, in sicer v aplikaciji Bussines Connect. V sistemu je trenutno 3152 dokumentov. Aplikacija omogoča tudi vnos in obravnavo neskladnosti, nadzor nad izvajanjem zunanjih in notranjih presoj ter ukrepov, podpira izvajanje vodstvenega pregleda, kvalifikacijo opreme in validacijo procesa. V primeru uvajanja novih informacijskih rešitev pa imamo možnost vnosa protokola validacije informacijske rešitve ter zaključkov.

Po pridobljenem certifikatu ISO 9001, smo začeli opaziti, da je vzdrževanje le tega težje kot sama pridobitev. Zaznavali smo, da pada elan in motiviranost zaposlenih in da ni pravega časa za izvajanje aktivnosti s področja SVK, povečevala se je tudi obremenjenost zastopnikov za kakovost. Tudi sami zaposleni, ki smo jih ob 10. obletnici certifikata zaprosili za mnenja in komentarje, so to potrdili:

- *»SVK je povečal obseg našega dela, je pa pozitivno vplival na kvaliteto našega dela. Pripomogel je k boljši standardizaciji postopkov in boljši sledljivosti.«*
- *»Nimam razporejenega časa za vzpostavljanje sistema kakovosti, le to moram opraviti med opravljanjem rutinskega dela, za to je to velikokrat stresno.«*
- *»Sistem je dobro zaživel, vendar je opaziti zamiranje in zmanjševanje tolerance. Potrebna je oživitvev in dodatna motivacija zaposlenih.«*

Podobne komentarje bi dobili tudi danes po 20 letih vzdrževanja sistema.

Kljub manjši motiviranosti za izvajanje aktivnosti, pogostim menjavam vodstva in drugim oviram, še vedno uspešno vzdržujemo certifikat ISO 9001. SIQ nas je na zadnji obnovitveni presoji pohvalil in v poročilu zapisal *«Sistem vodenja je zrel. Zavedanje zaposlenih o pomenu kakovosti in odličnosti storitev je na visoki ravni.»* Kar kaže na to, da SVK živi v nas zaposlenih in da smo ga sprejeli kot del našega dela. Po anketi SiOK Merjenje organizacijske klime in zadovoljstva zaposlenih, se odnos do kakovost v zadnjih treh letih ni bistveno spremenil:

Postavka	2020	2021	2022
Odnos do kakovosti	3,75	3,68	3,76
Zaposleni se čutimo odgovorne za kakovost našega dela	4,08	4,11	4,20

SVK smo v zadnjih letih nadgradili in dopolnili z zahtevami drugih mednarodnih standardov in akreditacij na področju medicinskih laboratorijev (ISO 15189) in na področje tkiv in celic (JACIE-Joint Accreditation Committee). SVK smo povezali v enovit integriran sistem, ki je kot konglomerat sestavljen iz zahtev različne zakonodaje in standardov. Vsako novo zahtevo vpeljujemo na način, da ohranjamo celovitost sistema. Sistem nam omogoča preglednejše, enostavnejše in skladnejše delovanje. Nenehno se izboljšujemo, manj je podvojenih aktivnosti, presoje so celovitejše, poraba virov pa optimalnejša. Na ta način se razvijamo v odlično organizacijo.

## Neskladnosti na Zavodu RS za transfuzijsko medicino

*Maja Grahek*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*maja.grahek@ztm.si*

Kaj je neskladje? Neskladje je vsakršno odstopanje od standarda, zakonodaje oz. dogovorjenega postopka dela. Kako še drugače poimenujemo neskladje? Ponekod lahko zasledimo tudi izraze kot so odklon, napaka, deviacija, neustreznost ipd..

Sistem beleženja in poročanja o neskladjih je element sistema vodenja kakovosti, ki omogoča odkrivanje kritičnih točk v procesu, zato je pomembno, da se odkrijejo, prepoznajo in analizirajo z namenom preprečitve napak in izboljšanjem postopka ali sistema vodenja kakovosti, nikakor pa se z odkrivanjem neskladij ne išče krivca, katerega bi bilo potrebno kaznovati.

Če se zaposleni in nadrejeni tega ne zavedajo, bodo napako lahko prikriili, saj je v človeški naravi, da za storjeno napako pride posledica tj. kazen. Pri neskladjih pa posledica ne sme biti kazen, ampak odprava vzroka za napako. Ob primerni obravnavi in iskanju vzrokov za napake lahko preprečimo ponavljanje oz. pogostost ponavljanja napak, ki bi lahko ogrozila naš končni produkt. Zato je lahko mišljenje, da se bo ob odkriti napaki kaznovalo domnevnega krivca zelo nevarno oziroma celo škodljivo.

Obravnavanje odkritih neskladij na oddelčnih sestankih je lahko v poduk tudi ostalim zaposlenim, saj so bistvo sistema vodenja kakovosti ravno zaposleni, ki s svojim delom prispevajo k vzdrževanju le tega.

Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (ZTM) že od leta 2005 neskladja obravnavamo po organizacijskem postopku OP-08 Beleženje neskladnosti. Postopek obravnava vodenje neskladnosti od njihove zaznave, beleženja, poročanja in korektivnih ukrepov.

Ugotovljeno neskladnost zabeleži osebje, ki je neskladnost ugotovilo, in sicer v obrazec OP-08 Priloga 2 Beleženje, poročanje in odprava neskladnosti. Po ugotovitvi neskladnosti sledi neposredna korekcija neskladnosti, če je le mogoča.

Nosilec procesa, če je potrebno za reševanje neskladja, določi odgovorno osebo za izvedbo in nato na podlagi ugotovljenega vzroka predlaga in uvede korektivne ukrepe, ki se zapišejo na obrazec.



Nosilec procesa lahko neskladje zaključi sam ali pa so za razrešitev slednjega potrebni ukrepi s strani drugih nosilcev druge organizacijske enote.

Pred zaključkom neskladja s strani nosilca procesa oz. odgovorne osebe je potrebna še opredelitev ali je imelo neskladje (medicinske) posledice za pacienta, zaposlene in javno zdravje, saj je bila to zahteva zunanje presoje po standardu ISO 15189.

Vsa neskladja morajo biti vnesena v aplikacijo BusinessConnect (BC). Vnesejo se lahko sproti ali naknadno, če osebe, ki je odkrilo neskladje, nima dostopa do aplikacije BC. Vnesejo se na način, da zastopnik za kakovost v svoji organizacijski enoti v aplikaciji BC izpolni »masko« za neskladja, izbere ključne podatke o neskladnosti, opredeli datum, ga šifrira in doda potrebne pripombe ter ga posreduje nosilcu svoje organizacijske enote. Nosilec nato svoje ugotovitve in morebitne korektivne ukrepe vpisuje v wordov dokument. Neskladje je potrebno obravnavati, ko se zgodi in ne šele po vnosu v aplikacijo BC.

Zapisi o neskladnostih se shranjujejo v aplikaciji BC (računalniško) in so trajno dostopni preko spletne aplikacije.

Nosilce procesa spodbujamo k uporabi modula Mape KU / PU Vir 2 v BC, ki je namenjen sledenju korektivnim ukrepom, ki so bili izrečeni v primeru večjega neskladja oz. ponavljajočih se neskladij.

V Službi vodenja sistema kakovosti o beleženju neskladij pripravimo polletno in letno poročilo.

Za šifriranje neskladij uporabljamo enotni šifrant zaveden v dokumentu SOP-H.K-01-P01 – Neskladja šifrant. Vsako neskladje se šifrira na dveh nivojih, razen kadar gre za neskladje povezano z neustreznim ravnanjem s celicami v drugih ustanovah, neustreznim medicinskim pripomočkom ali neskladjem, ki se ga po obstoječem šifrantu ne da opredeliti in se ga šifrira kot drugo. Neskladja, ki so opredeljena kot »transfundirana napačna komponenta, transfundirana komponenta ne ustreza zahtevam, napačno ravnanje s krvjo izven transfuzijskega centra, skorajšnje napake, reakcije pri dajalcih, reakcije pri bolnikih, tehnične težave in transport« je potrebno še dodatno šifrirati na drugem nivoju. Pomembno je, da se 1.nivo in 2.nivo ujemata (npr. neželen dogodek D, na 2. nivoju izbereš med oznakami skupine D).

Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino je bilo v letu 2022 zabeleženih 643 neskladij. V letu 2022 je bilo največ neskladij zabeleženih na področju skorajšnjih napak (361), reakcij pri dajalcih (99), tehničnih težav (69), transporta (46) in neskladij, ki se jih po obstoječem šifrantu ne da opredeliti (36). V letu 2023 bomo spremljali neskladja šifrirana pod drugo in eventualno v prihodnjem letu razširili šifrant. Pri skorajšnjih napakah izstopajo neskladja, ki so povezana z napačno določitvijo orientacijske krvne skupine (191), kjer gre večino pripisati napačni določitvi orientacijske krvne skupine na klinikah pri izvajanju obpostelnega testa. Veliko je neskladij, vezanih na prejete

pomanjkljive naročilnice, vzorce ali administrativne napake (87). Tu se beležijo napake tako s strani naročnikov kot s strani osebja na ZTM. S strani naročnika smo v letu 2022 8-krat zabeležili napačno kri v epruveti. Neskladja so bila zabeležena v Ljubljani (3), Novem mestu (2), Novi Gorici (2) in v Slovenj Gradcu (1).

Pri tehničnih težavah izstopajo neskladja povezana z informacijsko tehnologijo (51), pri neskladjih povezanih s transportom pa težave povezane z registratorji temperature (29). Neskladja šifrirana pod drugo so zelo specifična in se redko ponovijo ali sploh ne, zato jih je težko opredeliti v šifrantu neskladij.



Slika 1: Število obravnavanih neskladnosti na ZTM v zadnjih 10-ih letih (Vir: lasten)

Na sliki 1 je prikazano število zabeleženih neskladij v zadnjih 10-ih letih. Leta 2016 je bil nenaden porast zabeleženih neskladij zaradi novega šifranta, ki zajema tudi neskladja povezana s hemovigilanco. V letih 2020, 2021 in 2022 lahko opazimo manjši obseg zabeleženih neskladij, saj je naše delo krojila epidemija COVID. Predvidevamo, da se bo trend beleženja neskladij ponovno pričel povečevati. Število zabeleženih neskladij je povezano z uvajanjem ali opuščanjem metod dela, spremembo šifranta in drugih dejavnikov, ki vplivajo na proces dela. Letno tako zabeležimo in obravnavamo približno 700 neskladij. Večje število neskladnosti ne pomeni, da so zaposleni nedosledni ali neodgovorni pri svojem delu, ampak da je naš sistem vodenja kakovosti in naše dojemanje kakovosti dovolj zrelo, da tovrstnih primerov ne »pospravimo pod preprogo«, ampak jih zabeležimo, spremljamo in se na tak način izboljšujemo. O neskladnostih se odkrito

pogovorimo, jih obravnavamo, podamo korektivne in preventivne ukrepe ter ne kaznujemo tistega, ki je neskladje odkril.

Hvala vsem, ki dnevno skrbite za neskladja in vzdržujete sistem vodenja kakovosti!

## Presoje sistema vodenja kakovosti na Zavodu RS za transfuzijsko medicino

*Apolonija Uran*

*Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino*

*apolonija.uran@ztm.si*

### Uvod

Na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) imamo že od leta 2004 vzpostavljen sistem vodenja kakovosti (SVK) po standardu ISO 9001, ki predstavlja strateško usmeritev ZTM in omogoča kar najboljše izpolnjevanje osnovnega poslanstva zagotoviti varno, kakovostno in učinkovito preskrbo s krvjo, krvnimi komponentami in zdravili iz krvi ter skrbeti za razvoj transfuzijske in transplantacijske medicine ter naprednega zdravljenja. Sistem vodenja kakovosti je tako že vrsto let podvržen različnim inšpekcijskim nadzorom ter zunanjim in notranjim presojam.

Inšpekcijski nadzor je nadzor nad izvajanjem in spoštovanjem zakonov in drugih predpisov in ga izvršujejo inšpektorji kot uradne osebe s posebnimi pooblastili in odgovornostmi.

Presoja je sistematičen, neodvisen in dokumentiran proces pridobivanja stvarnih dokazov in njihovega objektivnega vrednotenja, da se ugotovi, v kolikšnem obsegu so izpolnjeni kriteriji presoje. Enostavno lahko presoje delimo na notranje ter na zunanje. Notranje presoje izvaja organizacija sama, zunanje presoje pa izvajajo nadzorstveni organi in druge pooblaščen organizacije ter certifikacijske hiše. V prispevku je opisano izvajanje notranjih in zunanjih presoj sistema vodenja kakovosti na ZTM.

### Notranje presoje na ZTM

Notranje presoje se na ZTM izvajajo že vse od pridobitve certifikata ISO 9001 in potekajo po organizacijskem postopku OP-09 Notranje presoje. Postopek opisuje načine presojanja, zahteve za notranje presojevalce in aktivnosti ob zaključku presoje. Namen notranje presoje je ugotoviti, ali sistem vodenja kakovosti ustreza zakonskim zahtevam in zahtevam standardov ter ali se učinkovito izvajajo postavljena notranja pravila in dogovori.

Na ZTM imamo trenutno šest usposobljenih notranjih presojevalcev. V triletnem obdobju so pregledani vsi primarni procesi (preskrba s krvjo, diagnostične storitve, preskrba s celicami in tkivi) kot tudi podporni procesi (proces kadrovanja, nabave, servisne dejavnosti, ...), ki se izvajajo

na ZTM in dislociranih enotah Centrih za transfuzijsko dejavnost. Če je potrebno, izvajamo tudi izredne notranje presoje kot npr. pred napovedano zunanjo presojo, na zahtevo vodstva, ob ugotovljeni večji neskladnosti. Uporabljene metode so razgovor s presojanecem, pregled dokumentacije sistema kakovosti, pregled prostorov in opreme ter pregled ostalih elementov SVK kot npr. pritožbe, ocena tveganja, neskladnosti, osebje, .... Kriteriji presoje so referenčni dokumenti: ISO 9001, ISO 15189, zahteve JACIE, zahteve EFI, dokumentacija SVK (standardni operativni postopki, postopki za ravnanje z opremo, zapisi) ter zakonodaja in podzakonski akti. Med presojo skupaj z nosilcem procesa iščemo priložnosti za izboljšave. V letu 2018 smo v IS Bussines Connect vzpostavili modul Presoje, v katerega vnašamo zaključna poročila presoj, tako notranjih kot zunanjih, ugotovitve presoj ter njihovo reševanje v obliki korektivnega ukrepa, korekcije oz. priporočila. Na ta način lažje sledimo statusom ukrepov in priporočil (v izvedbi, izveden, zaključen-učinkovit, zaključen-neučinkovit).

Tabela 1: Prikaz števila izvedenih notranjih presoj ter števila izrečenih ukrepov/priporočil med leti 2004 in 2022 (Vir: lasten)

Leto	Število NP (redne in izredne)	Število KU/PU
2004	22	122
2005	16	94
2006*	-	-
2007	15	94
2008	20	139
2009	18	177
2010	12	108
2011	20	163
2012	22	110
2013	21	127
2014	14	82
2015	16	86
2016	17	113
2017	16	108
2018	13	80
2019	19	56
2020	10	37
2021	17	47
2022	18	27
*V letu 2006 ni bilo NP (porodniška odsotnost)		

Najpogostejše ugotovljene pomanjkljivosti na notranji presoji predstavljajo nedoslednosti pri izpolnjevanju različnih obrazcev, vpeljava sprememb ne poteka vedno skladno s postopkom, usposabljanje zaposlenih ni dosledno zabeleženo, oprema pa je velikokrat pomanjkljivo obvladovana in manjkajo zapisi.

### **Zunanje presoje na ZTM**

ZTM je podvržen tudi različnim inšpekcijskim nadzorom in zunanjim presojam, ki jih izvajajo različni nadzorstveni organi kot npr. Javna agencija za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP) in Ministrstvo za zdravje (MZ), certifikacijske hiše kot npr. Slovenski inštitut za kakovost in odličnost (SIQ) ter akreditacijski organi Slovenska akreditacija (SA), Joint Accreditation Committee (JACIE) in European Federation for Immunogenetics (EFI).

JAZMP je leta 2008 začela s prvimi verifikacijskimi pregledi dejavnosti preskrbe s krvjo in dejavnosti preskrbe s človeškimi tkivi in celicami ter nam v istem letu izdala prvo dovoljenje za področje dejavnosti preskrbe s krvjo. Leto kasneje smo pridobili dovoljenje za področje dejavnosti preskrbe s tkivi in celicami.

Komisije s strani MZ izvajajo zunanje preglede medicinskih laboratorijev in podeljujejo dovoljenja za delo za dobo petih let.

V letu 2004 smo pridobili certifikat ISO 9001 s strani SIQ za vzpostavljen sistem vodenja kakovosti, ki smo ga kasneje integrirali in prepletli z zahtevami drugih mednarodnih standardov in akreditacij na področju medicinskih laboratorijev (ISO 15189), področju celic in tkiv (JACIE) ter tipizacije tkiv (EFI).

Najpogosteje ugotovljene pomanjkljivosti na zunanjih presojah v zadnjih letih se navezujejo na nepravilno obvladovanje dokumentov kakovosti in odstopanja od dobrih praks, pomanjkljive zapise ali odsotnost le teh ter na neurejeno pogodbeno razmerje z drugimi izvajalci. Vse ugotovljene pomanjkljivosti odpravimo v predpisanem roku, saj bi v nasprotnem primeru izgubili dovoljenje za delo. Ponavadi potekajo inšpekcijski pregledi in zunanje presoje redno letno, lahko pa je to obdobje tudi daljše, in sicer dve oz. pet let.

Tabela 2: Število inšpekcijskih nadzorov JAZMP in ugotovljenih pomanjkljivosti v letih od 2010 do 2022 (Vir:lasten)

Leto	Število nadzorov	Število pomanjkljivosti			Priporočila
		kritične	velike	ostale	
2010	12	1	122	164	/
2011	5	/	8	62	/
2012	5	/	35	70	4
2013	5	/	89	104	17
2014	5	/	3	29	8
2015	6	/	8	9	21
2016	3	/	1	25	3
2017	4	/	6	10	2
2018	5	/	4	50	6
2019	4	/	2	7	/
2020	2	/	/	16	2
2021	9	/	11	76	6
2022	3	/	3	16	2
<b>Σ</b>	<b>68</b>	<b>1</b>	<b>292</b>	<b>638</b>	<b>71</b>

### Zaključek

Vsak inšpekcijski nadzor in zunanja presoja ter še posebno notranje presoje so orodje za izboljšanje sistema vodenja kakovosti. Inšpektorji so bolj togi in strogi kot zunanji presojevalci. Včasih je nevarnost, da se presoja sprevrže v zbirokratizirano evidentiranje dejstev. Presoja vzpodbuja vodstvo, da pristopi k reševanju pomanjkljivosti. Preko presoj pridobivamo tudi nove izkušnje in znanja.

Pri notranjih presojah skupaj z nosilcem procesa iščemo boljše rešitve v procesu in spodbujamo nosilca po iskanju novih priložnosti za izboljšave.

Po drugi strani pa so presoje tudi strošek, kajti odpravljanje neskladnosti zahteva vire in čas. Če smo se odločili, da gremo po poti vzpostavitve in vzdrževanja SVK, nam presoje ne bi smele predstavljati bremena temveč le dodano vrednost.







**ZHS**

Združenje hematologov  
Slovenije