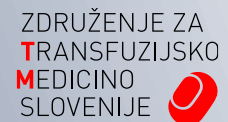


Združenje hematologov Slovenije (ZHS)



Združenje za transfuzijsko medicino Slovenije (ZTMS)



Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v hematologiji (SMSZT)

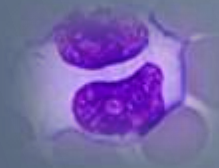


Hematološko laboratorijsko združenje (HLZ)



Zbornik povzetkov april 2024

Podčetrtek 12 – 13. April 2024



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 2024

Podčetrtek, 12.-13. april 2024

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 2024

Strokovni recenzenti: Matjaž Sever, Matevž Škerget, Barbara Skopec, Helena Podgornik, Tadej Furlan, Katarina Reberšek, Martina Fink, Boštjan Jovan, Alenka Dobrovoljc, Primož Požanel, Marko Cukjati, Irena Bricl, Polonca Mali, Irena Razboršek, Mojca Šimc, Vesna Galvani, Marjeta Maček

Uredili: Matevž Škerget, Boštjan Jovan, Marko Cukjati, Hermina Čibej

Založilo: Združenje hematologov Slovenije

Za založbo: Matevž Škerget

Spletna stran: www.zhs.si

Ljubljana 2024

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

COBISS.SI-ID 191888899

ISBN 978-961-95890-4-5 (PDF)

Vsebina

Ob rob 7. kongresu Združenja za transfuzijsko medicino Slovenije	6
Mikroskopski pregled krvnega razmaza in njegovi izzivi (HLZ)	1
Specifične najdbe v krvnem razmazu – pogled hematologa	1
Atipični limfociti – pogled onkologa	6
Posebnosti in redke najdbe v krvnem razmazu	10
Komentarji v izvidu krvne slike	12
Predstavitev magistrskih nalog (HLZ).....	16
Prepoznava cirkulirajočih endotelijskih celic in endotelijskih prekurzorskih celic s pretočno citometrijo.....	16
Mutacijski status gena <i>IGHV</i> in stereotipnost B-celičnega receptorja pri slovenskih bolnikih s kronično limfocitno levkemijo	20
Pridobljene motne hemostaze- diagnostika, delavnica (HLZ)	25
Laboratorijska diagnostika pridobljenih motenj hemostaze	25
Koagulacijski faktor XIII	30
Redke bolezni (ZHS)	34
Langerhansova histiocitoza in Erdheim-Chesterjeva bolezen	34
Hematološke novotvorbe ob sistemski mastocitozi	39
Nova zdravila pri zdravljenju PNH.....	45
Izkušnje zdravljenja z luspaterceptom	50
Hemofagocitna limfohistiocitoza ali prekomerno vnetje?	54
Uporaba zdravil za uravnavanja hemostatskega ravnovesja pri bolnikih s hemofilijo	59
CAR-T zdravljenje (ZHS, HLZ, SMSZT).....	65
Indikacije za zdravljenje z akademskimi CAR-T celicami v UKC Ljubljana	65
Laboratorijsko spremljanje in pomen po infuziji CAR-T celic.....	67
Ravnanje z gensko spremenjenimi organizmi v bolnišničnem okolju	72
Diseminirani plazmocitom (ZHS).....	76
Prvo zdravljenje diseminiranega plazmocitoma v letu 2024	76

Vloga reševalne »salvage« avtologne presaditve krvotvornih matičnih celic pri bolnikih z relapsom diseminiranega plazmocitoma.....	81
Naše izkušnje z bispecifičnimi protitelesi pri diseminiranem plazmocitomu	88
Ukrepanje pri sopojavih ob zdravljenju z bispecifičnimi protitelesi	94
Mieloproliferativne bolezni (ZHS, HLZ)	102
Preverjanje odstopanj v rezultatih hematološkega analizatorja	102
Novosti pri zdravljenju primarne mielofibroze	106
Kronična nevtrofilna levkemija, atipična kronična mieloična levkemija ali kaj drugega?	111
Pomen nestandardnih genetskih različic pri mieloproliferativnih boleznih	115
Vpliv predanalitskih odstopanj na izvide hemostaze.....	117
Zdravljenje indolentne sistemske mastocitoze.....	121
Strokovni sestanek medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v hematologiji (SMSZT).....	125
Uspešnost zdravljenja s CAR-T pri otrocih UKCLJ PEK.....	125
Nevroblastom- vloga medicinske sestre pri pripravi imunoterapije	133
Zahtevna vloga medicinskih sester v terapevtskih aferezah	138
Strategije spoprijemanja in zaščitni faktorji medicinskih sester v paliativni oskrbi.....	143
Samoinjiciranje zdravila za zdravljenje ITP - našemu bolniku prijazna možnost	148
Spolnost kot pomemben dejavnik kvalitete življenja pri bolnikih po presaditvi krvotvornih matičnih celic	153
Glasbena terapija	157
Imunohematologija (ZTMS)	162
Trombocitna protitelesa pri imunski trombocitopeniji	162
Transfuzijska obravnava variant RhD: prikaz primerov	168
Nacionalna shema zunanje ocene kakovosti imunohematoloških preiskav- 20 let delovanja	179
Transfuzijska medicina in ChatGPT	184
Hemovigilanca (ZTMS)	190
TACO - s transfuzijo povezana volumska preobremenitev	190
Dihalna stiska ob transfuziji krvi: izkušnje v UKC Maribor	201
Prikaz primera bolnice z nehemolitično vročinsko transfuzijsko reakcijo (NHVTR) in s transfuzijo povzročeno volumsko preobremenitvijo (TACO)	205

Poročilo Službe za hemovigilanco – leto 2023 v številkah	209
Preskrba s krvjo (ZTMS)	217
Sprememba EU zakonodaje: Uredba	217
Predstavitev EU projekta SUPPLY (Strengthening voluntary non-remunerated plasma collection capacity in Europe)	221
SUPPORT-E Project.....	223
Rezultati ankete zadovoljstva med krvodajalci SV Slovenija	225
Izkušnje po spremembi meril za izbor krvodajalcev	231
Klinične in laboratorijske značilnosti slovenskih krvodajalcev.....	236
Postopki pri pripravi component krvi za zagotavljanje varne transfuzije (ZTMS)	240
Izkušnje s patogensko inaktivacijo na ZTM	240
Challenges in implementing pathogen inactivation technique in Transfusion centre Celje ...	245
Izkušnje pri uvajanju patogene inaktivacije v CTM Maribor	247
Postopki pri pripravi komponent krvi za zagotavljanje varne transfuzije: Novosti na področju kontrole kakovosti	252
Kakovost v transfuzijski medicini	257
Quality management in transfusion medicine- the importance of international cooperation	257
Kakovost v transfuzijski medicini: Kontrola kakovosti krvnih komponent na ZTM (predstavitev dejavnosti Odseka za končno kontrolo kakovosti krvnih komponent)	259
Histovigilanca na OTS – pregled zadnjih 10 let	263
Spreminjajoči se svet in izzivi pri merilih za izbor krvodajalcev (ZTMS)	265
Emerging Infectious Threats to Blood Safety.....	265
Ocenjevanje trenutnega tveganja za prenos variantne Creutzfeldt-Jakobove bolezni s transfuzijo v Evropi	267
Obvladovanje Creutzfeldt-Jakobove bolezni v Sloveniji	274
Testiranje krvodajalcev na okužbe, ki se prenašajo s krvjo (ZTMS)	280
Presejalno testiranje krvodajalcev na označevalce okužb in prijave sumov na potransfuzijske okužbe v Sloveniji od 2014 do 2023.....	280
Zaznavanje HBV DNA v anti-HBc reaktivnih vzorcih krvi, ki so HBsAg in HBV DNA negativni pri presejalnem testiranju, z visoko občutljivimi molekularnimi tehnikami	284

Prevalenca in incidenca okužbe z virusom hepatitisa E (HEV) med krvodajalci v Sloveniji	288
Kontrole kakovosti pri testiranju krvodajalcev na označevalce okužb prenosljivih s krvjo	291
Izzivi dela na dislociranih enotah (ZTMS).....	297
Oskrba hematoloških bolnikov enodnevnice bolnišnice SB NM s komponentami krvi	297
Urgentna izdaja komponent krvi na Centru za transfuzijsko dejavnost Novo mesto.....	302
Organizacija dela v obliki neenakomerno razporejenega delovnega časa na CTD-jih.....	307
Zagotavljanje zalog krvnih pripravkov na dislocirani enoti Zavoda za transfuzijsko medicino v primeru elementarnih nesreč	311
Znanje potrebno za samostojno opravljanje dela na dislocirani enoti	314
Bolnišnični transfuzijski odbor- povezovalni člen med zdravstveno ustanovo in transfuzijsko službo	319
Presaditev krvotvornih matičnih celic (ZTMS)	321
Alogenska transplantacija KMC	321
Pogled onkologa na presaditev krvotvornih matičnih celic	326
Presaditve krvotvornih matičnih celic pri otrocih.....	329
Zbiranje in shranjevanje krvotvornih matičnih celic na Zavodu RS za transfuzijsko medicino	334
Bone Marrow Transplantation in Bosnia and Herzegovina	339
Celične terapije (ZTMS)	345
Optimizacija aferezni postopkov za celične terapije	345
Vpliv parametrov afereze na učinkovitost ločevanja – prikaz primera	349
Žilni pristopi pri aferezni postopkih	353
Virusno specifični limfociti T: nove indikacije, nove možnosti	357
Zdravljenje pediatrične bolnice s CMV/adeno/sarCov2 virusno specifičnimi limfociti - prikaz primera.....	362
Vloga ECP pri zdravljenju T celičnih limfomov	366
Napredna zdravljenja (ZTMS).....	370
Pregled naših bolnikov za CAR-T – Onkološki inštitut Ljubljana	370
Zdravljenje poobsevalne kserostomije pri bolnikih z rakom ustnega žrela z alogenskimi mezenhimskimi stromalnimi matičnimi celicami: protokol klinične raziskave.....	376
Gensko-modificirane MSC v onkologiji	379
Priprava naprednih celičnih zdravil v GMP okolju	381

Strokovni prispevki brez predavanja (ZTMS)	383
Validacija regularnih rezultatov testiranj in izdaje izvida predtransfuzijskih preiskav – inženir kot izvajalec.....	383
Določanje protiteles IgA in anti-IgA na ZTM, naše izkušnje in analiza rezultatov	386
Celice, tkiva in napredno zdravljenje v slovenski transfuzijski medicini 2024.....	391
Konstelacija eritrocitnih antigenov pri bolnikih zdravljenih z daratumumabom	399
Upravljanje sledljivosti komponent krvi v Transfuzijskem centru Splošne bolnišnice Celje....	406
Delovanje Centra za transfuzijsko dejavnost Izola na področju preskrbe s krvjo.....	408
Analiza števila sprejemov in odklonov krvodajalcev med leti 2009-2023	410
Avtomatiziran način dela v imunoematološkem laboratoriju	414
Rezultati presejalnega testiranja krvodajalcev na označevalce okužb v 25 letnem obdobju v severovzhodni Sloveniji.....	418
Alling blood donors in transfusion center General hospital Celje between 2019-2023.....	422
Spremembe krvne skupine ob hudem zagonu AIHA pri bolniku po alogenski PKMC-predstavitev primera z vidika transfuziologa.....	424
Validacija postopka priprave in kontrola kakovosti patogensko inaktiviranih trombocitov z metodo Intercept (Cerus)	429
Beleženje napak v transfuzijskem centru Splošne bolnišnice Celje med letom 2014 in 2023	431

Ob rob 7. kongresu Združenja za transfuzijsko medicino Slovenije

TRANFUZIJA- NAJSTAREJŠA OBLIKA ZDRAVLJENJA S CELICAMI

Hiter razvoj celične terapije še naprej preseneča medicinsko in laično javnost. Ker gre pri zdravljenju s celicami za prenos lastnih ali tujih celic bolniku, lahko imamo transfuzijo za najstarejšo obliko celičnega zdravljenja. Sprva je šlo seveda za neuspešno nadomestno zdravljenje s celicami, ki se v telesu prejemnika ne razmnožujejo, kar pričajo prvi zapisi o transfuzijah krvi l. 1492 in l. 1676, po odkritju krvnih skupin l. 1900 pa se je uspešneje nadaljevalo. Neuspešni so bili tudi poskusi prenosa živalskih celic z namenom pomlajevanja konec 19. in na začetku 20. stoletja. Zdravljenje s celicami, ki ohranijo tudi sposobnost razmnoževanja in diferenciacije pa se je pričelo šele po l. 1960 s presajanjem kostnega mozga in danes strokovna javnost govori o t.im. naprednem zdravljenju, to je zdravljenju s celicami, tkivi in gensko terapijo. Pri tem načinu zdravljenja lahko uporabljamo nespremenjene ali pa bistveno spremenjene celične pripravke, slednje pa imenujemo zdravila za napredno zdravljenje (ZNZ).

Vsako sestavino človeškega telesa, ki se odvzame dajalcu, imenujemo snov človeškega izvora (angl. Substance of Human Origin - SoHO). Preskrbo s SoHO, torej s krvjo, celicami in tkivi ter drugimi SoHO, trenutno urejajo v nacionalno zakonodajo prenesene evropske direktive. V prihodnje bo to področje urejala nova skupna Uredba EU o kakovosti in varnosti snovi človeškega izvora (SoHO), ki je v postopku sprejemanja¹.

Transfuzijske ustanove so bile zaradi svoje zgodovinske povezanosti s celičnimi pripravki in infrastrukturo že od samega začetka primerno mesto za razvoj tako celičnega zdravljenja kot tudi naprednih zdravljenj. V veliki meri pripravljajo tudi celične pripravke, ki so izhodiščni material za celično in tkivno terapijo ter napredna zdravljenja. Pogosto proizvajajo tudi zdravila iz plazme v lastnih frakcioniranih obratih. Zato se transfuzijske ustanove tudi najlažje prilagodijo pogojem za pridobitev statusa ustanove za celice in tkiva ter dovoljenja za proizvodnjo ZNZ. Številni avtorji zato pričakujejo nadaljevanje širitve in prodor naprednega zdravljenja v transfuzijskih ustanovah², ki so tako postale centri naprednega zdravljenja³. Zavod RS za transfuzijsko medicino (ZTM) ima dolgoletne izkušnje na področjih preskrbe s krvjo pa tudi preskrbe s celicami in tkivi ter naprednim zdravljenjem. V zadnjih 30 letih je razvil različne celične terapije, tkivno inženirstvo, banke celic in tkiv, transplantacijsko dejavnost z odvzemom in obdelavo matičnih celic, mednarodni register

¹ UREDBA (ES) št. 1394/2007 EVROPSKEGA PARLAMENTA IN SVETA z dne 13. novembra 2007 o zdravilih za napredno zdravljenje ter o spremembi Direktive 2001/83/ES in Uredbe (ES) št. 726/2004

² Horan A., Sarreth S., Tor H.W., Waters A. The expanding role of blood and tissue establishments in the development of advanced therapy medicinal products. *Cytotherapy* 00 (2024)1 -7.

³ Bönig Halvard, Feliciano Rich, Galea George, Homburg Keld, Rožman Primož, Weitekamp Lee Ann, Seifried Erhard. The role of blood establishments in cellular therapies: scope of activities. V: Folléa, Gilles (ur.). *Blood, tissues, and cells from human origin: the European Blood Alliance perspective*. Amsterdam: European Blood Alliance (EBA), cop. 2013., str. 255-275.

nesorodnih darovalcev kostnega mozga SlovenijaDonor, laboratorije za tipizacijo tkiv ter še nekatera druga področja naprednega zdravljenja, ki jih je tudi pomagal zakonsko urediti in jih danes izvaja po mednarodnih navodilih in standardih⁴. S tem je pridobil tudi vse zahtevane mednarodne akreditacije (ISO9002, EFI, JACIE, itd.). Uspeh je tudi nedavna pridobitev certifikata GMP (dobre proizvodne prakse). Med prva poskusna ZNZ v Sloveniji sodijo npr. alogenski trombociti za zdravljenje zlomov, ali pa krvotvorne matične celice za intrakardialno aplikacijo pri srčnem popuščanju, ki jih je ZTM pripravil v uspešnih raziskovalnih projektih z UKC v Ljubljani. Trenutno je ZTM tudi edina javna ustanova z dovoljenjem za proizvodnjo ZNZ⁵.

Medtem ko je transfuzijska dejavnost v Evropi večinoma javna in zaradi daljše tradicije tudi primerno urejena, prihaja na področju produkcije ZNZ do kompeticije med javnim in zasebnim sektorjem kot tudi znotraj obeh. Rezultat je nepreglednost pri razvoju bioterapij. Podobno se dogaja v Sloveniji, kjer želijo proizvajati ZNZ tudi privatne ustanove, kar je načeloma zelo dobrodošlo, vendar se ustanavljanja lotevajo še javne ustanove, ki podvojujejo dejavnost ZTM-ja, in njihovo financiranje povrh poteka iz javnih sredstev. Za zaščito javnih zdravstvenih sredstev, ki so omejena, bi bilo smiselno najprej oblikovati jasno strategijo mreže javnih ustanov za celice in tkiva.

Kaže, da sta kljub navidezni zakonski pokritosti tako program preskrbe s krvjo kot tudi program preskrbe s celicami in tkivi ter naprednim zdravljenjem pomanjkljiva. Stroka se je namreč razvijala hitreje kot pa državna administracija, zato potrebujemo poleg jasne **nacionalne politike preskrbe s krvjo in zdravlili iz krvi** tudi **nacionalno politiko preskrbe s celicami, tkivi in naprednim zdravljenjem**, ki mora vsebovati uradno stališče države o ključnih organizacijskih, finančnih, tehničnih in pravnih aspektih te preskrbe. Edino odgovorno je, da se pri tem javna sredstva usmeri v ustanove, ki že imajo vso ustrezno infrastrukturo, kadre in know-how. Le na ta način bo zdravstveni sistem bolnikom v Sloveniji omogočil sodobno zdravljenje s človeško krvjo, celicami in tkivi ter ZNZ.

Pri zagotavljanju tega zdravljenja v javni zdravstveni mreži je torej nujno na državni ravni uskladiti principe racionalnosti in sodelovanja med proizvajalci in uporabniki ZNZ, ki je dolga leta dobro delovalo in tako preprečiti, da bi parcialni lokalni interesi prevladali nad nacionalnimi.

Primož Rožman in Dragoslav Domanović

Ljubljana, Amsterdam, april 2024

⁴ Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application. <https://www.edqm.eu/en/guide-to-the-quality-and-safety-of-tissues-and-cells-for-human-application1>

⁵ Urban Švajger, Primož Požanel. ZTM zagotavlja zdravila za napredno zdravljenje. Revija ISIS,18: marec 2024;18-19.

Mikroskopski pregled krvnega razmaza in njegovi izzivi (HLZ)

Specifične najdbe v krvnem razmazu – pogled hematologa

Klara Šlajpah

KO za hematologijo, UKC Ljubljana

klara.slajpah@kclj.si

Kljub razvoju avtomatizacije in molekularnih tehnik v hematologiji ostaja mikroskopski pregled krvnega razmaza, ali kompletna krvna slika (KKS), ključna, cenovno dostopna in hitra diagnostična metoda. Nudi vpogled v delovanje kostnega mozga (KM) in pomaga odkrivati različne, potencialno smrtno nevarne krvne bolezni, pri čemer je hitro ukrepanje lahko življenjskega pomena. Okrog 70 % kliničnih odločitev temelji na rezultatih laboratorijskih testov, zato je natančna interpretacija KKS nujna za uspešno klinično prakso. V hematologiji se pregled krvnega razmaza šteje za "peti vitalni znak", enako pomemben kot ostali vitalni znaki. KKS običajno predpiše zdravnik glede na klinične indikacije ali pa laboratorij na podlagi neobičajnih rezultatov ali opozoril s strani hematološkega analizatorja. Pomembno je, da so kriteriji za testiranje jasni in vnaprej določeni ter usklajeni z naročnikom preiskave.

Eritrocitna krvna slika

Razumevanje nepravilnosti glede oblike in velikosti eritrocitov pomaga pri diagnosticiranju in razlikovanju med vrstami anemije. Ovalna makrocitoza je npr. povezana z megaloplastnimi anemijami zaradi pomanjkanja folatov ali vitamina B12, mielodisplazijo in nekaterimi zdravili (hidroksikarbamid), med tem ko je okrogla povezana z boleznimi jeter in alkoholizmom.

Vključki v eritrocitih so pogosto posledica nepravilnega zorenja eritrocitov, oksidativnih poškodb celic ali okužb. Howell-Jollyjeva telesa so ostanki DNK, ki jih najdemo pri bolnikih brez delujoče

vranice (po splenektomiji, funkcionalna asplenija), bazofilne punktacije so denaturirani fragmenti RNK v citoplazmi eritrocitov, povezane s talasemijo, zastrupitvijo s svincem ali arzenom, hudimi okužbami, sideroblastno in megaloblastno anemijo ter pomanjkanjem pirimidin 5' nukleotidaze. V eritrocitih lahko zasledimo intracelularne parazite kot sta malarija ali Babesia. Retikulociti so nezreli eritrociti, ki se sprostijo iz sinusoidov kostnega mozga in potrebujejo približno dva dni, da dozori v perifernem obtoku in kažejo na aktivnost kostnega mozga. Eritroblasti so nezrele celice eritrocitne vrste, ki imajo jedro in jih običajno ne opazimo v periferiji, razen pri novorojenčkih. Kažejo na hudo obremenitev KM; njihovo prisotnost v periferni krvi skupaj z nezrelimi levkociti imenujemo levkoeritroblastna krvna slika. Najdemo jo pri fibrozi KM, stresnih dejavnikih v KM (hipoksija, huda hemolitična ali hemoragična anemija, huda sepsa), infiltraciji KM (levkemija, limfom, plazmocitom, sekundarne metastaze), obremenitvi KM z ravnimi dejavniki (G-CSF) in ekstramedularni hemopozi. Shizociti (fragmentirani eritrociti) so delno raztrgani ali fragmentirani eritrociti. Najpogosteje nastanejo zaradi mehanske poškodbe eritrocitov, ki je posledica fibrinskih vlaken, tvorjenih pri intravaskularni hemolizi (diseminirana intravaskularna koagulacija (DIK), mikroangiopatična hemolitična anemija (MAHA)). Kadar so v krvni sliki prisotni trombocitopenija, anemija in shizociti (> 1 %) in ob tem prisotni parametri hemolize gre za življenje ogrožajoče stanje – trombotično trombocitopenično purpuro (TTP). Običajno gre za avtoimunsko bolezen z nastankom protiteles proti ADAMTS13. Nezdravljena ima več kot 90 % smrtnost, če pa že ob sumu na TTP (trombocitopenija in anemija s shizociti) pričnemo s plazmaferezami in kortikosteroidi je smrtnost pod 10 %. Eritrociti se običajno v krvnem razmazu razporedijo enakomerno, zlepljanje ali nenormalne razporeditve so znak bolezenskega stanja. Rouleaux (rulo) formacije eritrocitov nastanejo zaradi zvečane koncentracije proteinov (fibrinogena, imunoglobulinov ali prisotnosti monoklonskih imunoglobulinov). Zlepljeni eritrociti se hitreje posedajo in so vzrok pospešene sedimentacije pri vnetjih in plazmocitomu. Aglutinacija je vidna kot skupek eritrocitov pri bolezni hladnih aglutininov zaradi IgM protiteles, pri okužbi, limfatičnih novotvorbah (Waldenstromova makroglobulinemija) ali avtoimunskih boleznih. V hemogramu opazimo značilno kombinacijo zmanjšane koncentracije eritrocitov in močno povečanega MCV.

Levkocitna krvna slika

V krvnem razmazu so levkociti največje celice, ki se razlikujejo po jedru. Različne tipe lahko identificiramo glede na velikost, obliko in barvo jedra (strukturo in gostoto kromatina) ter barvo in prisotnost citoplazme ter vključkov v citoplazmi. V periferni krvi se delež polimorfonuklearnih celic v primerjavi z mononuklearnimi celicami spreminja s starostjo, vendar je pri odraslih nevtrofilcev največ. Zmanjšanje ali povečanje števila levkocitov je lahko absolutno ali relativno. Nevtrofilija je pogosto odziv na bakterijske okužbe, drugi vzroki so akutna vnetja (npr. miokardni infarkt), opekline, uporaba kortikosteroidov, maligne bolezni, kronična mieloična levkemija (KML). Pomik v levo se uporablja za opis nenormalnega povečanja deleža mieloičnih prekurzorjev. Huda nevtrofilija s prisotnostjo granulocitnih prekurzorjev na različnih stopnjah zorenja, imenovana levkemoidna reakcija se lahko pojavi med hudimi infekcijskimi ali toksičnimi procesi ter pri nekaterih malignomih. Razlikovanje med levkemoidno reakcijo in KML je lahko težavno zaradi pomanjkanja očitne morfološke atipije pri granulocitnih prekurzorjih. Prisotnost nezrelih ali netipičnih monocitov in granulocitnih prekurzorjev, kot so mieloblasti, promielociti in mielociti, v periferni krvi lahko kaže na hematološko bolezen. Pojav celic, ki so bolj nezrele od metamielocitov, se običajno šteje za patološkega, razen pri novorojenčkih in med nosečnostjo. Levkemični "hiatus" ali vrzel v zaporedju zorenja celic je pomembna diagnostična značilnost, pogosto povezana z akutno levkemijo. Hipogranulacijo citoplazme in druge znake displazije v periferni krvi najdemo pri mielodisplastičnih neoplazmah (MDS). Pomik v desno ali hipersegmentacija nevtrofilcev je diagnostična značilnost megaloblastne anemije. Limfociti v periferni krvi imajo različno morfologijo. Reaktivni (aktivirani) limfociti so veliki, z vrezanim ali nepravilnim jedrom in obilno citoplazmo, lahko imajo nukleole. Limfoblasti, so prav tako veliki in primerljivi z aktiviranimi limfociti, vendar imajo visoko razmerje jedro:citoplazma. Relativno limfocitozo običajno opazimo pri otrocih, mlajših od 5 let, akutnih virusnih okužbah, boleznih vezivnega tkiva, tirotoksikozi in adrenokortikalni insuficienci. Vzroki za absolutno limfocitozo so reaktivna stanja, kot so infekcijska mononukleozna, hepatitis, okužbe s citomegalovirusom, oslovski kašelj, kronične znotrajcelične bakterijske okužbe (tuberkuloza ali bruceloza), kronična limfocitna levkemija (KLL) in akutna limfoblastna levkemija (ALL). Gumprechtove sence nastanejo zaradi mehanske poškodbe

levkocitov med izdelavo krvnega razmaza, še posebej nagnjeni k temu so krhki limfociti. Te sence lahko opazimo pri vseh vrstah krvnih bolezni, pa tudi v razmazih normalne krvi, vendar je povečano število teh senc zelo značilno za KLL. Pri alergijah in okužbah s paraziti se lahko pojavi znatna eozinofilija, izrazita (>1500/ml) pa kaže na hipereozinofilni sindrom (zlasti s pridruženo poškodbo tkiva) ali neoplastično entiteto, če je pridružena celična displazija (kronična eozinofilna levkemija). Bazofilija se pojavlja pri preobčutljivostnih stanjih in malignih stanjih, kot so limfomi in KML. Monociti so največje celice na periferiji. Monocitoza se pojavlja pri kroničnih bakterijskih okužbah (tuberkuloza), vnetnih stanjih (Crohnova bolezen) in hematoloških malignomih (KML in akutna mieloična levkemija (AML), zlasti FAB M4/5).

Trombocitna krvna slika

Trombociti so brez jedra, okrogle ali ovalne oblike, v njih so vidne azurofilne granulacije, ki so razporejene po celotni citoplazmi ali zgoščene v sredini trombocita. Trombocitopenija je lahko posledica zmanjšane nastajanja (MDS), povečane periferne destrukcije (DIK) ali povečane sekvestracije v vranici (hipersplenizem). Trombocitopenija je lahko lažna (psevdo-trombocitopenija) pri agregaciji trombocitov, ki jo povzroči EDTA, ali prisotnosti strdkov v vzorcu krvi. Vzroki za trombocitozo so lahko večje operacije, stanje po splenektomiji, krvavitve, akutna hemoliza, pomanjkanje železa, okužbe, bolezni vezivnega tkiva (npr. sistemski lupus eritematosus, revmatoidni artritis). Lahko je povezana z malignimi boleznimi, zlasti mieloproliferativnimi novotvorbami (MPN). Z mikroskopskim pregledom razmaza krvi lahko opazimo velike trombocite, ki so običajno posledica hiperaktivnosti megakariocitov zaradi povečanih potreb. Lažno povišano število trombocitov iz avtomatskega analizatorja je lahko posledica fragmentov eritrocitov pri MAHA, fragmentov levkemičnih celic ali celo glivic. Gigantski trombociti (velikosti eritrocita ali več) se pojavljajo pri dednih stanjih, kot so sindrom Bernard Soulier, May-Haggelinova anomalija ali sindrom Wiskott Aldrich in pridobljenih stanjih, kot so megaloplastna anemija in MPN.

Zaključek

Diagnoza, ki temelji na KKS mora biti v skladu s kliničnimi simptomi pacienta. Hematologi igrajo ključno vlogo pri povezovanju simptomov s hematološkimi izvidi za postavitve specifičnih ali diferencialnih diagnoz, še posebej pri iskanju hematoloških obolenj ali sistemskih bolezni s hematološkimi znaki. To zahteva poglobljeno razumevanje različnih citoloških anomalij in njihovih vzrokov. Medtem ko lahko nekatere bolezni diagnosticiramo neposredno s KKS, v drugih primerih ta služi kot uvodni korak, ki vodi k nadaljnji diagnostiki. Hitro prepoznavanje resnih stanj s pregledom krvnega razmaza omogoča takojšnje ukrepanje, kar je lahko ključnega pomena za reševanje življenj. Zato je nujno, da se v hematologiji redno preverja "peti vitalni znak" – razmaz periferne krvi pacienta.

Literatura:

1. Zver S, editor. Kako brati krvno sliko. Ljubljana: Pliva; 2018.
2. Nwogoh B, Transfusion B, State E, Transfusion B, State R. Peripheral blood film - a review. *Ann Ibd Pg Med.* 2014;12(2):71–9.
3. Berce K, Božnar Alič E, Podgornik H, Trampuš Bakija A, Žontar D. Priporočeni postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza. Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo (SZKK); 2012.
4. Invernizzi R. *Haematologica Atlas of Hematologic Cytology*: Edited by: Carlo L. Balduini. *Haematologica* 2020;105(s1):1-800.
5. Zver S, editor. *Nujna stanja v hematologiji*. Ljubljana: Pliva; 2019.
6. Podgornik H, Pretnar J, Černelč P. *Atlas krvnih celic*. Ljubljana: Slovensko društvo za hematoonkološko diagnostiko; 2013.

Atipični limfociti – pogled onkologa

Aleš Christian Mihelač

Oddelek za zdravljenje limfomov, Onkološki inštitut Ljubljana

amihelac@onko-i.si

Današnja obravnava bolnika zahteva minimalno dobro anamnezo, kliničen pregled in laboratorijske preiskave. Pri slednjih so nepogrešljive preiskave krvne slike, ki lahko razkrijejo ali vsaj postavijo sum na marsikatero obolenje. Osnovna analiza krvne slike je avtomatiziran proces v aparatu, vendar pa se dostikrat pojavi situacija, ko se ne da enostavno pojasniti citopenije (levkopenijo, anemijo ali trombopenijo), levkocitoze (predvsem limfocitoze in monocitoze) in znakov hemolize ali pa se sumi na primarno krvno obolenje, tako na akutne kot tudi kronične mielo- ter limfoproliferativne bolezni. Razmaz periferne krvi lahko v teh primerih osvetli problem oz. nejasnosti v krvni sliki z natančnejšim vpogledom v morfologijo celic, poleg tega je uporaben tudi pri spremljanju učinka zdravljenja tovrstnih bolezni. (1)

V prispevku se bomo osredotočili na limfocitozo, ki je definirana v grobem kot porast absolutnega števila limfocitov na več kot $4,0 \times 10^9/L$, vendar se meja nekoliko spreminja po državah (v Sloveniji je npr. meja $3,5 \times 10^9/L$). V omenjeno populacijo so zajeti vsi podtipi limfocitov, tj. limfociti B in T ter naravne celice ubijalke (NK celice). Vzroki za porast limfocitov so številni in nemalokrat je težko razlikovati med reaktivnimi/benignimi in malignimi spremembami. (2)

Vzroki reaktivnih limfocitoz so najpogosteje infekcijske narave. Med virusnimi obolenji gre lahko za okužbo z virusom Epstein-Barr (EBV), citomegalovirusom (CMV), virusom humane imunске pomanjkljivosti (HIV) ob primarnih okužbah, najdemo jo lahko tudi pri okužbah z drugimi virusi, npr. pri gripi, virusnem hepatitisu, mumpsu, rdečkah, okužbah z adenovirusi, humanim T limfocitnim virusom tipa 1 (HTLV-1) in Covid-19. (2, 3)

Od bakterijskih okužb lahko najdemo limfocitozo pri bolezni mačje opraskanine (*Bartonella henselae*), oslovskem kašlju (*Bordetella pertussis*), brucelozni, sifilisu in malariji in tuberkulozi. Od parazitov jo lahko povroča toksoplazma in babezija. (2)

Od neinfektoloških vzrokov se lahko limfocitoza pojavi pri preobčutljivostnih reakcijah zaradi določenih zdravil (npr. alopurinol, karbamazepin, vankomicin, sulfonamidi), po aplikaciji adrenalina (v smislu demarginacije levkocitov v periferni krvi) ali pa kot odziv na zdravljenje (npr. pri ibrutinibu, zaviralcu Brutonove tirozin kinaze (BTKi), v začetnih fazah zdravljenja, ko je limfocitoza bolj odraz izplavljanja celic iz limfoidnih organov v periferno kri). Poleg tega jo lahko najdemo ob močnih stresnih situacijah, npr. pri epileptičnemu statusu ali akutnem kardiološkem stanju, ter po splenektomiji, kjer lahko raven teh celic ostane stabilna skozi leta. (2)

Kronična limfocitna levkemija (KLL) je eden od najpogostejših vzrokov za klonalno limfocitozo. Pogoj za diagnozo je prisotnost vsaj $5,0 \times 10^9/L$ klonalnih B-limfocitov ali več. Mediana starosti ob diagnozi bolezni je 70 let, le okoli 9 % vseh bolnikov je mlajših od 45 let, pogosteje so prizadeti moški. Razlikovati jo treba ob monoklonalne limfocitoze B (MBL), pri kateri so pogoji prisotnost manj kot $5,0 \times 10^9/L$ klonalnih B-limfocitov ter odsotnost hepatosplenomegalije, limfadenopatije, citopenij v krvni sliki ter z boleznijo povezanih simptomov. Letno napreduje 1-2 % vseh monoklonalnih B-limfocitov v KLL. Na razmazu periferne krvi so klonalni limfociti tipično majhni, z zreлим jedrom, ozkim robom citopazme, dokaj značilne (vendar ne izključno značilne za KLL) so tudi t. i. Gumprechtove sence – gre za razpadle celice limfocitov, ki nastanejo zaradi mehanskih poškodb pri pripravi razmaza krvi. (4)

Infiltracijo kostnega mozga, posledično pogosto tudi levkemizacijo limfomskih celic, najdemo tudi pri tretjini vseh primerov nekaterih ne-Hodgkinovih limfomov. Primeri teh so folikularni limfom, limfom plaščnih celic, marginalnocelični limfom, difuzno velikocelični B-celični limfom (DVCBL), limfoplazmacitni limfom in zreli T-celični limfomi. Pri petini primerov bolnikov z ne-Hodgkinovim limfomom, ki imajo infiltracijo kostnega mozga, je opazno neskladje med morfologijo limfomskih celic v kostnem mozgu ter iz drugih tkiv, npr. iz bezgavke (nemalokrat gre za transformacijo nizkomalignega limfomskega obolenja v visokomaligno obolenje v določenih infiltratih). (5)

Morfologija limfomskih celic se razlikuje med zvrstmi limfomov. Pri celicah folikularnega limfoma je npr. opazna globoka zarez v jedro, pri limfomu plaščnih celic številne zareze in vdolbine v jedru, pri limfoplazmacitnem limfomu je jedro ekscentrično ležeče, z modro citoplazmo in objedrnem svetlejšem obročem, vilozne limfocite opazimo pri spleničnem limfomi marginalne cone, medtem ko so drobni lasasti izrastki vidni pri dlakastocelični levkemiji. (1)

Sama morfologija limfomskih celic v periferni krvi sicer ni zadostna za natančnejšo določitev zvrsti limfomskega obolenja, temveč je treba opraviti imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom, kar nas bolj usmeri v končno diagnozo, ter analizirati vzorce kostnega mozga (tako punktata kot tudi biopsijo). Treba je poudariti, da je pri končni diagnozi limfomskega obolenja še vedno odločilna histopatološka preiskava biopsije reprezentativnega infiltrata; le redko je kostni mozeg edina dostopna lokalizacija za postavitev diagnoze limfomskega obolenja. (6)

Literatura

1. Adewoyin AS, Nwogoh B. Peripheral blood film – a review. *Ann Ib Postgrad Med.* 2014; 12(2): 514-9.
2. Hamad H, Mangla A. Lymphocytosis. V: *StatPearls. Treasure Island (FL, ZDA): StatPearls Publishing; 2024 [citirano dne 23.3.2024]. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549819/>*
3. Sugihara J, Shibata S, Doi M, Shimmura T, Inoue S, Matsumoto O, et al. Atypical lymphocytes in the peripheral blood of COVID-19 patients: A prognostic factor for the clinical course of COVID-19.
4. Hallek M, Al-Sawaf O. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *Am J Hematol.* 2021; 96(12): 1679-705.
5. Arber DA, George TI. Bone marrow biopsy involvement by non-Hodgkin's lymphoma: frequency of lymphoma types, patterns, blood involvement, and discordance with other sites in 450 specimens. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29(12): 1549-57.

6. Freedman AS, Friedberg JW, Aster JC. Clinical presentation and initial evaluation of non-Hodgkin lymphoma. UpToDate, Wolters Kluwer; 2024 [citirano dne 25.3.2024].
Dostopno na: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-and-initial-evaluation-of-non-hodgkin-lymphoma#H25>

Posebnosti in redke najdbe v krvnem razmazu

Tadej Furlan

Specializirani hematološki laboratorij, Klinični oddelek za hematologijo, UKC Ljubljana.

tadej.furlan@kclj.si

Krvni razmaz je diagnostični postopek, ki se uporablja za pregled krvnih celic. Pregled krvnega razmaza je osredotočen na oceno različnih vrst krvnih celic, kot so rdeče krvne celice (eritrociti), bele krvne celice (levkociti) in trombociti. Z diferencialno krvno sliko dobimo podatke o relativnem deležu posameznih vrst levkocitov v venski krvi. Pri izdelavi krvnega razmaza se vzorec krvi, odvzete z antikoagulantom EDTA, nanese na objektna stekelca in se ga pobarva po Pappenheimu. Razmaze pripravimo tako, da na sredino predmetnega stekla, tik pod matiranim robom kanemo kapljo krvi. Pri tem si lahko pomagamo s posebnim nastavkom za pripravo razmazov, s katerim prebodemo zamašek ali s pomočjo pipete. Volumen kaplje krvi mora biti tolikšen, da dobimo ustrezno dolžino razmaza (3-4 cm). V naslednjem koraku se s krovnim steklom, ki je nagnjen približno pod kotom 45° , dotaknemo kaplje krvi in jo razpotegnemo po celotni širini predmetnega stekelca. Pri tem moramo dobiti razmaz z ustreznim področjem, v katerem štejemo celice. V tem področju se eritrociti ne smejo prekrivati ampak morajo biti porazdeljeni drug ob drugem. Pomemben dejavnik pri kakovosti razmaza je njegova debelina, ne sme biti pretanek ali predebel. Z debelino je povezan tudi čas sušenja preparatov pred barvanjem. Tako pripravljene razmaze je potrebno posušiti na zraku in jih šele nato pobarvati. Pri barvanju po Pappenheimu uporabljamo dve vrsti reagentov; May-Grünwald in Giemsa. S tema dvema reagentoma dosežemo fiksacijo in barvanje celic, saj pride do interakcij alkalnih in kislih barvil (eozin, metilensko modro in azur) s posameznimi komponentami celic, kot so citoplazma, vključki v citoplazmi, kromatin,... Novejši aparati nam že omogočajo tudi avtomatsko pripravo in barvanje krvnih razmazov. Na ta način si v laboratoriju lahko olajšamo delo, čas priprave razmazov se skrajša in posledično lahko veliko prej izdamo izvid. Na ta način nimamo več težav z različno pripravljenimi razmazi (predolgi, prekratki,

predebeli, pretanki,...), saj je nanos kaplje krvi na objektno stekelce in naklon krovnega stekelca avtomatiziran.

S to metodo lahko pod mikroskopom jasno razlikujemo med različnimi vrstami krvnih celic.

Pri pregledu krvnega razmaza izkušen laboratorijski delavec natančno pregleda vzorec krvi pod mikroskopom. Pomembno je, da se ocenjujejo različne značilnosti krvnih celic, kot so oblika, velikost, barva in prisotnost morebitnih nepravilnosti ali vključkov ter na prisotnost mlajših oblik.

Levkociti: potrebno je biti pozoren na morebitne morfološke nepravilnosti jedra ali citoplazme. V izvidu diferencialne krvne slike je potrebno opisati tudi morebitne vključke v celicah (Auerjeve paličice, toksične granulacije, vakuole,...).

Eritrociti: pozorni moramo biti na velikost, obliko, obarvanost ter različne vključke (Bazofilne punktacije, Howell-Jollyeva telesca,...).

Trombociti: opisati moramo spremembe velikosti, granuliranosti in razporeditve trombocitov (agregati trombocitov, satelitski trombociti).

Krvni razmaz je relativno hiter in poceni diagnostični postopek, ki omogoča zdravnikom hitro pridobiti pomembne informacije o zdravstvenem stanju pacienta. Kljub svoji preprostosti je zelo informativen in lahko ponudi dragocen vpogled v pacientovo zdravstveno stanje. Čeprav je pogosto uporabljen za diagnosticiranje različnih stanj pa ima tudi svoje omejitve. Ravno zaradi teh omejitev se je potrebno za celostno diagnostiko hematoloških obolenj posluževati tudi bolj kompleksnih metod, kot so pretočna citometrija in molekularno genetske metode.

Literatura

1. Berce. K., Božnar Alič E., Podgornik H., Trampuš Bakija A., Žontar D. Priporočeni postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza. Slovensko združenje za klinično kemijo. 2012.
2. Podgornik H., Pretnar J., Černelč P. Atlas krvnih celic. 2. izd. Ljubljana: Hematološko laboratorijsko združenje, 2023.

Komentarji v izvidu krvne slike

Helena Podgornik, Katarina Reberšek

KO za hematologijo, UKC Ljubljana

helena.podgornik@kclj.si

Mikroskopski pregled krvnega razmaza je edini način, s katerim nedvomno prepoznamo morfološka odstopanja v krvni sliki. Kaj, kdaj in kako poročamo morfološke spremembe v krvni sliki, predpisujejo mednarodna priporočila, na njih sloneča priporočila imajo tudi slovenski laboratoriji. Medtem ko morfološka odstopanja v levkocitni krvni sliki delno podaja že številčni del diferencialne krvne slike, pa na morfološka odstopanja v eritrocitni in trombocitni krvni sliki opozarjamo izključno s komentarji. Iz tega jasno izhaja, da so komentarji ne le dodana vrednost, pač pa so ob patoloških spremembah nujen del izvida krvne slike. Za poročanje morfoloških sprememb v opombe k izvidu mikroskopske diferencialne krvne slike imamo precej natančno opredeljena merila in navodila. Opombe oziroma komentarji gotovo ne smejo vnašati zmede. Namenjeni so namreč lažji in hitrejši odločitvi klinika pri obravnavi bolnika, zato je potrebno njihovo polno razumevanje na strani naročnika. Ne le pri sumu na določeno krvno bolezen, v veliko pomoč so lahko tudi za širši vpogled v bolezensko dogajanje pri posamezniku. Za oblikovanje jasnih komentarjev je potrebno suvereno obvladovanje citomorfologije na strani laboratorijskega osebja. To mora natančno vedeti, katere najdbe so pričakovane, da ne pride do prekomernega vnašanja opomb.

Mikroskopski pregled krvnega razmaza navadno opravimo zaradi številčnih odstopanj ali sumljivih opozoril, ki jih izda hematološki analizator. Prav zaradi tega je večina teh opozoril uvrščena v odločitvena merila, ki laboratoriju narekujejo, da z mikroskopskim pregledom krvnega razmaza preveri dejansko prisotnost morfoloških odstopanj. Pri celicah levkocitne vrste razvrščamo celice glede na njihovo zrelost ter sistematično pregledamo in vrednotimo odstopanja v značilnostih jedra in citoplazme.

Nezrele celice mieloične vrste poročamo v DKS kot ločene skupine celic in če morfološko ne odstopajo od tistega, kar pričakujemo od mlajših razvojnih stopenj, potem komentarji niso potrebni. Načeloma pa vsa izrazita morfološka odstopanja v strukturi jedra in citoplazme sodijo v komentarje. Pri levkemično spremenjenih celicah lahko opazimo spremembe, ki jasno kažejo na maligno preobrazene celice in so zato dragoceno opozorilo pri hitrejši obravnavi bolnika. Takšne so Auerjeve paličice v mieloblastih ali Sultanina telesca v promielocitih. Blasti so tudi sicer lahko morfološko zelo raznoliki in opombe vključujejo opise takšnih morfoloških značilnosti (izrastki citoplazme, zažeta jedra...). Izrazita vakualizacija ali granulacija citoplazme granulocitov opozarjata na okužbe. V opombe sodi tudi hiper/hipogranulacija citoplazme ter hiper/hiposegmentacija jedra.

Limfocitna vrsta je zahtevna zaradi prekrivnosti med atipičnimi limfociti in blasti ter atipičnimi in reaktivno spremenjenimi limfociti. Opombe, ki opisujejo morfološka odstopanja v limfocitni vrsti lahko pomagajo zlasti takrat, ko posameznih podvrst limfomskih celic ne diferenciramo ločeno. Limfociti z izrastki citoplazme, preložena jedra ter izrazita jedrca nakazujejo na prisotnost atipičnih limfocitov. Obilna citoplazma heterogene populacije celic pa na verjetno prisotnost reaktivnih limfocitov. Veliki granulirani limfociti so normalno prisotni v krvni sliki. Šele njihova številčnost, ki presega 25% je razlog, da nanje posebej opozarjamo v opombah.

Monocitna vrsta je precej heterogena, zato v opombah najmanjkrat opozarjamo na odstopanja v tej vrsti. Če smo dovolj suvereni, potem promonocite lahko diferenciramo v ločeno skupino celic, sicer pa med blaste, pri čemer lahko opozarjamo na njihove posebnosti.

Opombe h krvni sliki so kot rečeno edini način vrednotenja morfologije eritrocitne in trombocitne vrste. Raznovrstnost morfoloških sprememb v eritrocitni krvni sliki je velika, obenem je kvantifikacija sprememb težja kot pri levkocitni vrsti. Uporabljamo semikvantitativno, tristopenjsko ocenjevanje izrazitosti (blaga, zmerna, izrazita) ali številčnosti (posamezni, maloštevilni, številni) sprememb. Harmonizacija poročanja morfoloških sprememb v eritrocitni in trombocitni krvni sliki je vnesla nekaj pomembnih sprememb v njihovo poročanje v izvide. Pri morfoloških lastnostih, ki jih objektivno vrednoti hematološki analizator (velikost, vsebnost

hemoglobina), se pri oceni odstopanj opremo na parametre analizatorja (MCV, MCH, RDW) in opombe semikvantitativno poročamo skladno z njimi. Ob tem pa moramo prepoznati tudi stanja, kjer so vrednosti eritrocitnih parametrov zavajajoče (npr. dvojne populacije eritrocitov). Pri poročanju morfoloških sprememb v eritrocitni populaciji se je zelo dvignil prag za kakršnokoli poročanje. Odstopanj najnižje stopnje (npr. posamezni akantociti, blaga hipokromija) praviloma ne poročamo več. Večino teh sprememb namreč v majhnem številu najdemo pri večini razmazov in niso povezane z resnimi oziroma specifičnimi bolezenskimi stanji. Zato njihovo poročanje ne doprinaša k boljši obravnavi bolnika, pač pa lahko vnaša zmedo. Za odstopanja so postavljene številčne vrednosti za deleže posameznih morfoloških sprememb, ki jih opredeljujemo s posamezno semikvantitativno stopnjo. Te vrednosti so precej visoke. V razmazu moramo npr. opaziti vsaj 5% ehinocitov, da jih sploh poročamo in kar 20%, da jih poročamo kot številne. Izjema so shizociti in drepanociti, za katere imamo mnogo nižje meje poročanja, ker so klinično pomembne.

Najmanj opomb h krvni sliki je namenjeno trombocitni vrsti. Glede na manjšo zanesljivost hematoloških analizatorjev pri določitvi trombocitnih indeksov in parametrov pa je ob izrazitih odstopanjih vendarle potrebno, da jih poročamo v opombe.

Prepoznavanje morfoloških sprememb krvnih celic je v veliki meri odvisno od znanja in subjektivne presoje posameznika, ki ocenjuje krvni razmaz. V laboratorijih imamo dobre podlage za objektivizacijo najdb in harmonizacijo njihovega poročanja. Tako kot morajo laboratorijski strokovnjaki pripraviti natančna in pregledna merila za pregled krvnega razmaza, morajo poenotiti in natančno oblikovati tudi opombe k izvidu krvne slike. Večino morfoloških sprememb se namreč poroča večkrat in te je potrebno poročati enotno. Laboratorijski informacijski sistemi večinoma podpirajo pripravo seznamov opomb. Le izjemoma najdemo morfološka odstopanja, za katera vnašamo proste opise.

Med poročanimi morfološkimi odstopanji so nekatera, ki narekujejo hitro ukrepanje, ker je bolnikovo življenje neposredno ogroženo, druge pa nadaljnjo diagnostiko v smeri prepoznavanja krvne bolezni. Ostala so lahko v pomoč pri prepoznavanju drugih bolezenskih dogajanj pri bolniku.

Zato so morfološke najdbe, ki jih laboratoriji poročajo v opombe k izvidom diferencialne krvne slike, pomemben dodaten rezultat k številčnim vrednostim diferencialne krvne slike, ki ga nikakor ne gre zanemariti ali prezreti.

Literatura

1. Buoro S, Da 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
2. Palmer L, Briggs C, McFadden S, Zini G, Burthem J, Rozenberg G, et al. SJ. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(3):287-303.
3. Trimoreau F, Galois AC, Genevieve F, Bardet V, Cornet <https://icp.bmj.com/content/70/5/395> E, Hurst JP et al. Harmonisation of full blood count reports, recommendations of the French-speaking cellular haematology group (GFHC). *J Clin Pathol* 2017;70: 395-402.
4. <https://www.szklm.si/si/vsebina/projekti-zdruzenja/delovne-skupine> (dostopano 29.3.2024)
5. Genevieve F, Galois AC, Mercier-Bataille D, Wagner-Ballon O, Trimoreau F, Fenneteau O et al. Smear microscopy revision: propositions by the GFHC. *Feuillets de Biologie* 2014;317: 1-9.
6. Constatino BT. Reporting and grading of abnormal red blood cell morphology. *Int J Lab Hematol* 2015;37: 1-7.

Predstavitev magistrskih nalog (HLZ)

Prepoznavna cirkulirajočih endotelijskih celic in endotelijskih prekuzorskih celic s pretočno citometrijo

Katarina Klinar, Helena Podgornik, Katarina Reberšek

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

katarina.klinar@kclj.si

Cirkulirajoče endotelijske celice (CEC) so zrele celice, ki se ob žilni poškodbi sprostijo v kri in tako predstavljajo obetaven označevalec endotelijske poškodbe. K popravilu poškodovanega endotelija pa prispevajo endotelijske prekuzorske celice (EPC), ki izvirajo iz kostnega mozga in sodelujejo pri obnovi žil, saj imajo sposobnost, da po mobilizaciji iz kostnega mozga preko krvi pridejo na mesto poškodbe žilja, tam proliferirajo in tako vzdržujejo endotelij »zdrav«. Pomembne pa so tudi pri nastanku novih žil. EPC zato predstavljajo možen označevalec endotelijske tkivne obnove. Spremembe v številu CEC in EPC so bile dokazane pri različnih srčno-žilnih, ledvičnih, avtoimunih in infekcijskih boleznih, sladkorni bolezni ter (hematoloških) malignih obolenjih.

EPC in CEC so v krvi izjemno redke, zato je zelo pomembno, da za njihovo določanje uporabljamo občutljivo metodo. Za njihovo prepoznavo in kvantifikacijo je pogosto uporabljena pretočna citometrija, saj dopušča analizo velikega števila celic v relativno kratkem času, poleg tega omogoča večparametrsko analizo posamezne celice, kar je še posebej pomembno, saj ne poznamo celičnega označevalca, ki bi bil popolnoma specifičen za omenjene celice. Njihova prepoznavna tako temelji na uporabi kombinacije različnih antigenov izraženih na površini CEC in EPC.

V Specializiranem hematološkem laboratoriju smo pripravili in validirali 7-barvni panel za prepoznavo CEC in EPC s pretočno citometrijo. V panel smo vključili najpogosteje uporabljene označevalce omenjenih celic, to so CD34, CD45, CD133, CD146 in CD309, poznan tudi kot receptor

za endotelijski rastni faktor-2 (VEGFR-2). Utemeljitev uporabe posameznih označevalcev je prikazana v preglednici 1. Za izključitev vpliva nespecifične vezave protiteles smo poleg specifičnih celičnih označevalcev v panel vključili tudi označevalec živosti 7-aminoaktinomycin (7-AAD) in barvilo Syto40, s katerim označimo le celice, ki vsebujejo nukleinske kisline. Poleg tega pa smo za vsak vzorec uporabili tudi izotipsko kontrolo.

Tabela 1: Utemeljitev uporabe posameznih označevalcev CEC in EPC.

OZNAČEVALEC	RAZLOG UPORABE
CD34	Označevalec CEC, EPC in krvotvornih matičnih celic
CD45	Izključitev levkocitov iz analize
CD133	Razlikovanje med CEC (CD133-) in EPC (CD133+)
CD146	Označevalec CEC
VEGFR-2	Označevalec EPC
Syto40	Izključitev celic brez nukleinskih kislin, kar prispeva k zmanjšanju nespecifičnih signalov
7-AAD	Izključitev mrtvih celic, na katere se protitelesa pogosto vežejo nespecifično

CEC smo prepoznali kot žive celice z jedrom, ki so CD45 negativne ali šibko pozitivne/CD34 pozitivne/CD146 pozitivne/CD133 negativne. EPC pa kot žive celice z jedrom, ki so CD45 šibko pozitivne/CD34 pozitivne/VEGFR-2 pozitivne/CD133 pozitivne.

Ker je v naš protokol vključeno tudi določanje CD34 in CD45, ki sta pomembna za prepoznavo krvotvornih matičnih celic (KMC), smo na podlagi določanja le-teh dokazali, da je postopek ponovljiv, poleg tega določanje števila KMC z našo metodo glede na Spearmanov koeficient korelacije kaže na zelo visoko povezanost z rezultati določitve KMC po protokolu ISHAGE (*International Society of Hematotherapy and Graft Engineering*), ki ga za določanje KMC uporabljamo v vsakdanji klinični praksi.

Vzorci periferne krvi za določitev CEC in EPC morajo biti analizirani takoj po odvzemu, saj že po 4 h shranjevanja tako pri sobni temperaturi kot pri 4 °C njihovo število pade za več kot 20 % glede na začetno vrednost. Vzorce pa moramo med transportom hraniti pri sobni temperaturi, kar je še posebej pomembno pri določitvi EPC, ki jih po 4 h hrambe pri 4 °C nismo več zaznali. Zato bi bilo priporočljivo preveriti stabilnost vzorcev ob uporabi sredstva za stabilizacijo celic.

Točnost metode smo dokazali s klinično validacijo, in sicer z določanjem CEC in EPC pri pacientih s sladkorno boleznijo tipa 1, ki so bili vključeni v kontrolirano, randomizirano, intervencijsko študijo, katere glavni namen je bil ugotoviti smiselnost dopolnilnega zdravljenja z dvema antidiabetikoma, za katera je bil dokazan ugoden vpliv na srčno-žilni sistem. Pacienti v testnih skupinah so bili zdravljeni z semaglutidom, ki deluje kot analog glukagonu podobnega peptida-1 (GLP-1) ali zaviralcem natrij-glukoznega prenašalnega sistema 2 (SGLT- 2) empagliflozinom. Medtem ko pacienti v kontrolni skupini dopolnilnega zdravljenja niso prejeli. Število CEC se je po 12 tednih dopolnilnega zdravljenja značilno znižalo pri pacientih, ki so prejeli semaglutid, medtem ko se je pri pacientih, ki so prejeli semaglutid ali empagliflozin, število EPC značilno povečalo. V kontrolni skupini, pričakovano, značilnih razlik v številu CEC in EPC nismo zaznali. Kljub dobljenim rezultatom pa so EPC z uporabljenim imunofenotipom v periferni krvi zelo redke oziroma je njihova (do)ločitev otežena, še posebej zaradi šibke intenzitete fluorescence za VEGFR-2 glede na izotipsko kontrolo, zato bi bilo v prihodnje potrebno določiti imunofenotip, ki ima največjo diagnostično občutljivost in specifičnost.

Literatura

1. Lanuti P, Rotta G, Almici C, Avvisati G, Budillon A, Doretto P: Endothelial Progenitor Cells, Defined by the Simultaneous Surface Expression of VEGFR2 and CD133, are not detectable in Healthy Peripheral and Cord Blood. *Cytometry A* 2016; 89: 259–70.
2. Fadini GP, Baesso, Albiero M, Sartore S, Carlo A, Avogaro A: Technical notes on endothelial progenitor cells: Ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis* 2008; 197: 496–503.

3. Almici C, Neva A, Skert C, Bruno B, Verardi R, Di Palma A, et al. Counting circulating endothelial cells in allo-HSCT: an ad hoc designed polychromatic flowcytometry-based panel versus the CellSearch System. *Sci Rep.* 2019 Jan 14;9:87.
4. Lanuti P, Simeone P, Rotta G, Almici C, Avvisati G, Azzaro R, et al. A standardized flow cytometry network study for the assessment of circulating endothelial cell physiological ranges. *Sci Rep.* 2018 Apr 11;8:5823.

Mutacijski status gena *IGHV* in stereotipnost B-celičnega receptorja pri slovenskih bolnikih s kronično limfocitno levkemijo

Saša Milanović

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

45960@kc-lj.si

Mentor: izr. prof. dr. Helena Podgornik, spec. med. biok., spec. lab. med. gen.

Somentor: dr.RH. Sandra Šučurović, mag. biol. mol.

Kronično limfocitno levkemijo (KLL) uvrščamo med limfatične novotvorbe zrelih limfocitov B ali ne-Hodgkinove limfome. Predstavlja najpogostejšo obliko levkemije v zahodnem svetu. Nastane zaradi razraščanja rakavo spremenjenih zrelih limfocitov B, ki se kopičijo v kostnem mozgu (KM), krvi in sekundarnih limfatičnih organih. KLL pri številnih bolnikih poteka indolentno in je ne zdravimo. Redkeje se pojavi v agresivni obliki, ki jo je potrebno čimprej začeti zdraviti. Ključni preiskavi za potrditev diagnoze predstavljata pregled krvne slike, ki vključuje tudi mikroskopski pregled krvnega razmaza, in imunofenotipizacija. Med najpomembnejše napovedne dejavnike sodi mutacijski status gena *IGHV*.

Mutacijski status gena IGHV

Predstavlja neodvisen dejavnik, ki ostaja med boleznijo nespremenjen, zato zadošča enkratna določitev z metodami sekvenciranja. Omogoča razvrstitev bolnikov v 2 podskupini-mutirano (M-) ter nemutirano (ang. *unmutated*, U-) KLL. Za M-KLL je značilna manj kot 98% identičnost z zarodno progo, za U-KLL pa več kot 98% identičnost. S številnimi raziskavami so ugotovili, da je M-KLL ugodnejša, saj so pri večini primerov zaznali indolentni potek. Pri bolnikih z U-KLL so poleg značilnega agresivnega poteka zaznali še določene neugodne genomske nepravilnosti, hitrejš

napredovanje bolezni in pretežno neugodne klinične izide (krajše celokupno preživetje in preživetje brez napredovanja bolezni) v primerjavi z M-KLL.

Pomembno odkritje so predstavljali primeri bolnikov z nepričakovanimi kliničnimi in biološkimi značilnostmi glede na mutacijski status gena *IGHV*. Nakazali so na heterogenost KLL, ki ni samo posledica razlik v mutiranosti omenjenega gena. Pojasniti so jo uspeli s stereotipnostjo B-celičnega receptorja (BCR).

Stereotipnost BCR

Stereotipnost BCR predstavlja pojavnost strukturno zelo podobnih ali identičnih receptorjev pri nesorodnih bolnikih. Posameznike s stereotipnimi BCR na podlagi določenih kriterijev razdelimo na posamezne podtipe. Primeri znotraj posameznega podtipa so si podobni z vidika imunogenetike, genetike in epigenetike. Poleg tega pri njih opazimo podoben klinični potek in izide ter odziv na zdravljenje. Najpogostejši podtipi in njihove glavne značilnosti so predstavljeni v Preglednici 1. Po najnovejših smernicah Evropskega konzorcija za izvajanje raziskav o KLL za leto 2022 v laboratorijski izvid navedemo le podtipa KLL#2, ki predstavlja neugoden napovedni dejavnik ne glede na mutacijski status gena *IGHV*, in KLL#8, ki je povezan s povečanim tveganjem za Richterjevo transformacijo.

Preglednica 1: Glavne značilnosti najpogostejših podtipov stereotipnih BCR (Prirejeno po (1))

Podtip	Status SHM (M-/U-KLL)	Značilen gen <i>IGHV</i>	Genomika	Klinični potek
KLL#1	U-KLL	<i>IGHV 1, 5, 7</i>	Del(11q), različice v genu <i>NOTCH1</i>	Agresiven
KLL#2	M- in U-KLL	<i>IGHV3-21</i>	Del(11q), Različice v genu <i>SF3B1</i>	Agresiven
KLL#4	M-KLL	<i>IGHV4-34</i>	Del(13q)	Indolenten
KLL#8	U-KLL	<i>IGHV4-39</i>	+12, Različice v genu <i>NOTCH1</i>	Agresiven, tveganje za RT

Del(11q)- delecija na dolgem kraku kromosoma 11, Del(13q)- delecija na dolgem kraku kromosoma 13, +12- trisomija kromosoma 12, RT- Richterjeva transformacija

Rezultati

Za potrebe magistrske naloge smo uporabili podatke bolnikov s KLL z naročeno preiskavo mutacijski status *IGHV*, ki so jih v okviru rutinske obravnave sprejeli v Specializiranem hematološkem laboratoriju (SHL) med letoma 2016 in 2022. Vsi bolniki so oddali soglasje za izvedbo preiskav in uporabo anonimiziranih podatkov v raziskovalne namene, kar je odobrila etična komisija UKC Ljubljana (140223/točka2). Zbirali smo podatke o spolu bolnikov, mutacijskem statusu gena *IGHV*, genih *IGHV-D-J*, stereotipnosti BCR in mutacijskem statusu *TP53*. S pomočjo statističnega testa Chi kvadrat (χ^2) smo ugotavljali povezanost sledečih spremenljivk: stereotipnost BCR in mutacijski status gena *IGHV*, nepravilnosti gena *TP53* in mutacijski status gena *IGHV*, mutacijski status gena *IGHV* in nepravilnosti gena *TP53* ter spol.

Namen zbiranja navedenih podatkov je bil primerjati rezultate z navedbami iz literature, da bi ugotovili, če je preiskava mutacijski status *IGHV* v SHL dovolj kakovostna in če so v slovenski populaciji prisotne morebitne posebnosti.

Zbrali smo podatke 434-ih bolnikov s KLL. Večino (64%) so predstavljali moški. Prevladoval je nemutiran status gena *IGHV* (60%). Najpogosteje prisotni geni *IGHV* so bili: *IGHV1-69*, *IGHV4-34*, *IGHV3-23*, *IGHV1-2*, *IGHV3-30*, *IGHV3-48*, *IGHV3-21*, *IGHV3-7*, *IGHV4-39* in *IGHV3-11*. Vsi, z izjemo *IGHV4-34*, *IGHV3-23* in *IGHV3-7*, ki so prevladovali pri bolnikih z M-KLL, so bili večinoma prisotni pri bolnikih z U-KLL. Vsi navedeni podatki so v skladu z literaturnimi navedbami. Podatki o stereotipnosti BCR so edini odstopali od navedb v literaturi. Odkrili smo jo pri 12% bolnikov, kar je manj od deleža (30–35%), navedenega v literaturi. Poleg tega smo le pri dveh bolnikih našli podtip KLL#8 in pri nobenem KLL#4, ki sta dva izmed štirih najpogostejših podtipov. Preostala dva (KLL#1 in KLL#2) sta prevladovala tudi v obravnavani populaciji. Večina bolnikov (več kot 80%) je imela nemutirani gen *TP53*.

Z uporabo testa χ^2 smo dokazali, da se skladno z navedbami v literaturi spremembe v genu *TP53* in stereotipni BCR statistično pogosteje pojavljajo pri nemutiranemu statusu gena *IGHV*. Značilnih povezav med spolom bolnikov in mutacijskim statusom gena *IGHV* ter nepravilnostmi gena *TP53* nismo uspeli dokazati. Ugotavljamo, da so razlike v deležih moških in žensk z nemutiranim statusom gena *IGHV* in nepravilnostmi gena *TP53* posledica večjega števila moških v našem vzorcu, ki je posledica večje pogostosti KLL pri moških.

S to nalogo smo dobili prvi celovit vpogled v mutacijski status gena *IGHV* pri slovenskih bolnikih s KLL. Glede na dobro primerljivost naših rezultatov z literaturnimi navedbami bi lahko sklenili, da je kakovost preiskave ustrezna. O posebnostih v populaciji, kljub določenim odstopanjem, ne moremo govoriti. Nanje bi lahko sklepali, če bi bilo število naših bolnikov podobno kot v obsežnih raziskavah v literaturi in bi ugotovili vidnejša odstopanja.

Literatura

1. Vlachonikola E, Sofou E, Chatzidimitriou A, Stamatopoulos K, Agathangelidis A. The Significance of B-cell Receptor Stereotypy in Chronic Lymphocytic Leukemia: Biological and Clinical Implications. *Hematol Oncol Clin North Am.* avgust 2021;35(4):687–702.
2. Zver S. Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične limfatične levkemije. *Zdr Vestn.* 2010;10.
3. Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Agathangelidis A, Baliakas P, idr. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations. *Leukemia.* julij 2017;31(7):1477–81.
4. Ten Hacken E, Gounari M, Ghia P, Burger JA. The importance of B cell receptor isotypes and stereotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* februar 2019;33(2):287–98.
5. Agathangelidis A, Chatzidimitriou A, Chatzikonstantinou T, Tresoldi C, Davis Z, Giudicelli V, idr. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: the 2022 update of the recommendations by ERIC, the European Research Initiative on CLL. *Leukemia.* avgust 2022;36(8):1961–8.

Pridobljene motne hemostaze- diagnostika, delavnica (HLZ)

Laboratorijska diagnostika pridobljenih motenj hemostaze

Ksenija Dvoršak

Klinični oddelek za hematologijo, Specializirani hematološki laboratorij, UKC Ljubljana

ksenija.dvorsak@kclj.si

Laboratorijska diagnostika pridobljenih motenj hemostaze se osredotoča na prepoznavanje in obravnavo motenj v procesu strjevanja krvi, ki so ključni za preprečevanje krvavitev. Pridobljene motnje strjevanja krvi so lahko del patofiziologije številnih bolezni, vključno s srčno-žilnimi, jetrnimi, avtoimunskimi in malignimi motnjami. Razvijejo se kasneje v življenju posameznika. Vzroki so lahko različni, vključno s pomanjkanjem vitamina K, boleznimi jeter, diseminirano intravaskularno koagulacijo (DIK), von Willebrandovo bolezen, hemofilijo in drugimi stanji. Prepoznavanje simptomov in laboratorijskih znakov je ključ do diagnoze. Pridobljene motnje lahko vodijo do različnih kliničnih izidov, od manjših krvavitev do smrtno nevarnih stanj, pri čemer je ključnega pomena hitra in natančna diagnostika.

Hemostaza vključuje kompleksne procese, v katerih sodelujejo trombociti, koagulacijski faktorji in krvne žile.

Teste hemostaze razdelimo glede na njihov namen na presejalne, diagnostične in na teste za spremljanje zdravljenja. Prepoznavanje bolezni v laboratoriju začnemo s preiskavami prvega reda, kot so določanje števila trombocitov in merjenje časov strjevanja krvi (zapiralna časa Kol/Epi in Kol/ADP). Odvisno od rezultata, za opredelitev bolezni, sledijo preiskave drugega reda, kot so optična agregometrija, preiskave za von Willebrandovo bolezen. Posebno pozornost namenjamo nepojasnjenim podaljšanjem protrombinskega časa / Mednarodno normalizirano razmerje (PČ/INR), aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (APTČ) in trombinskega časa (TČ), saj lahko kažejo na specifične motnje v koagulacijskem sistemu. V laboratoriju se izvajajo tudi testi za

ugotavljanje prisotnosti specifičnih antikoagulantnih zdravil (npr. heparin) in kvantitativno merjenje fibrinogena, D - Dimera ter koagulacijskih faktorjev.

Preiskave so ključne za določanje specifičnih terapevtskih pristopov, vključno z obravnavo pomanjkanja koagulacijskih faktorjev, ter za razlikovanje med dednimi in pridobljenimi stanji, ki vplivajo na hemostazo. Učinkovito upravljanje s temi motnjami zahteva celovit pristop, ki vključuje tako klinično oceno kot tudi podrobno laboratorijsko analizo.

Teste hemostaze izvajamo stopenjsko.

Pri obravnavi nepojasnjeno podaljšanega aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (APTČ) ponovimo testiranje APTČ, da izključimo laboratorijsko napako ali prehodno motnjo. Ocenimo klinični kontekst in pacientovo anamnezo glede uporabe antikoagulantov. Preverimo zgodovino krvavitev, trombotičnih motenj ali avtoimunskih stanj in nedavno izpostavljenost heparinu. Opravimo osnovne koagulacijske teste, vključno s PČ/INR, TČ, fibrinogenom (Fib), D-Dimer-om in določitvijo števila trombocitov ter zapiralnim časom Kol/Epi in Kol/ADP. Tako dobimo bolj celovito sliko koagulacijskega sistema. Če so testi patološki, izmerimo Anti - Xa, da izločimo vpliv antikoagulantnega zdravljenja. Sledijo preiskave drugega reda hemostaze, koncentracija (antigen) in aktivnost von Willebrandovega faktorja in FVIII ter mešalni test s 50% normalne plazme – APTČ. Če se APTČ normalizira, to kaže na pomanjkanje faktorja, medtem ko persistenca podaljšanja nakazuje prisotnost inhibitorja. Če mešani test kaže na pomanjkanje faktorja, sledijo specifični testi za določitev aktivnosti posameznih koagulacijskih faktorjev (faktorji VIII, IX, XI, XII). Če mešani test kaže na prisotnost inhibitorja, izvedemo dodatne teste za identifikacijo specifičnega inhibitorja, kot je lupusni antikoagulant ali specifični inhibitorji koagulacijskih faktorjev (določitev titra protiteles - Bethesda test).

Algoritem laboratorijskih testov za nepojasnjeno podaljšan PČ/INR je usmerjen v iskanje vzroka za motnjo v zunanji in skupni poti koagulacije. Preverimo zgodovino pacienta za morebitno uporabo antikoagulantov (npr. varfarin) ali drugih zdravil, ki lahko vplivajo na PČ/INR. Izvedemo mešalni test s 50% normalne plazme – PČ. Če se PČ normalizira, to kaže na pomanjkanje faktorja, medtem ko persistenca podaljšanja nakazuje prisotnost inhibitorja. Če mešani test kaže na

pomanjkanje faktorja, testiranje usmerimo na faktorje zunanje poti koagulacije FVII in FV. V primeru suma na pomanjkanje vitamina K še FII, FX in FIX. Če mešani test kaže na prisotnost inhibitorja, izvedemo dodatne teste za identifikacijo specifičnega inhibitorja, kot je lupusni antikoagulant ali specifični inhibitorji koagulacijskih faktorjev (določitev titra protiteles - Bethesda test).

Nepojasnjeno podaljšanje trombinskega časa (TČ) zahteva sistematičen pristop, saj lahko kaže na več možnih vzrokov, vključno s hipofibrinogenemijo, disfibrinogenemijo, prisotnostjo heparina ali drugih antikoagulantov in drugih stanj. Algoritem laboratorijskih testov pri nepojasnjeno podaljšanem TČ je namenjen identifikaciji osnovnega vzroka. Nizka raven fibrinogena (hipofibrinogenemija) ali nenormalna funkcija fibrinogena (disfibrinogenemija) lahko povzročita podaljšanje TČ. TČ ocenjuje zadnjo stopnjo koagulacije (trombinska cepitev fibrinogena v fibrin). Podaljša se lahko tudi s heparinsko aktivacijo antitrombina. Reptilaza (kačji strup) prav tako aktivira fibrinogen v fibrin. Če je reptilazni čas normalen in je trombinski čas podaljšan, je to dokaz, da vzorec plazme vsebuje heparin.

Laboratorijska diagnostika pridobljenih motenj hemostaze zahteva celovit pristop, ki vključuje tako osnovne kot napredne laboratorijske teste. Razumevanje teh testov in njihova pravilna interpretacija sta ključna za pravilno diagnozo in upravljanje pacientov z motnjami hemostaze. Področje se hitro spreminja, zato je potrebno tesno sodelovanje vseh vključenih v vodenje bolnikov. Zaradi kompleksnosti hemostatskega sistema pa je pogosto potrebna multidisciplinarna obravnava, vključno z hematologi, laboratorijskimi strokovnjaki in drugimi specialisti, za optimizacijo pacientove oskrbe.

Literatura:

1. Martin Ehrenschwender, Juergen Koessler, Kirsten Brunner, Udo Steigerwald, A 77-Year-Old Man with a Prolonged Activated Partial Thromboplastin Time, *Clinical Chemistry* 58:10 1402–1407 (2012)
2. Richard Curtis Godby, Radhika Gangaraju, Jori E. May, Ajitha Kommalapati, Rita Paschal, Marisa B. Marques; Congenital and acquired disorders of secondary hemostasis, March 2022
3. N Alli, J Vaughan, S Louw, S Moodly, M Patel, Acquired bleeding disorders, *S Afr Med J* 2018;108(3):159-165.
4. Giuseppe Lippi, Massimo Franchini, Emmanuel J. Favaloro, Diagnostics of Inherited Bleeding Disorders of Secondary Hemostasis: An Easy Guide for Routine Clinical Laboratories, *Semin Thromb Hemost*

Koagulacijski faktor XIII

Martina Fink

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

martina.fink@kclj.si

Faktor XIII (FXIII), imenovan tudi fibrin stabilizirajoči faktor, je transglutaminaza, ki se nahaja v krvi in deluje kot faktor koagulacije. Odkrit je bil leta 1944. To, da je pomanjkanje FXIII klinično pomembno, pa je bilo opaženo leta 1961, kar je zadnje med vsemi faktorji koagulacije.

Za vzdrževanje hemostaze je FXIII nujen in njegovo pomanjkanje povzroča krvavitve, ki so odvisne od stopnje pomanjkanja FXIII. Intrakranialne krvavitve so najpogostejši vzrok smrti bolnikov s pomanjkanjem FXIII. Pomanjkanje FXIII razdelimo na težko (nemerljiva raven ($< 0,05$ E / ml), srednje ($< 0,30$ E / ml) in lahko ($> 0,3$ E / ml). Ravni pod $0,05$ E/ml so zelo redke in predstavljajo veliko ogroženost za bolnike. Ker so rezultati presejalnih testov hemostaze (protrombinski čas (PČ), aktivirani parcialni tromboplastinski čas (APTČ) trombinski čas (TČ), čas krvavitve in število trombocitov) v mejah referenčnega območja ob pomanjkanju FXIII, njegovega pomanjkanja s presejalnimi testi hemostaze ne moremo zaznati in posumiti nanj. Vse to močno oteži diagnostiko pomanjkanja FXIII. Zato mora biti diagnostika pomanjkanja FXIII ciljna, ki temelji na kliničnih opažanjih. Pomanjkanje FXIII je zato verjetno najbolj poddiagnosticirano in spregledano pomanjkanje med vsemi faktorji koagulacije.

V krvi se FXIII nahaja kot neaktiven heterotetramer, ki je sestavljen iz dveh verig A (katalitična) in dveh verig B (prenašalna). V aktivno obliko FXIII pretvori trombin v prisotnosti Ca^{2+} ionov. FXIII deluje tako, da premreži verige fibrina v fibrinskem strdku. FXIII tudi kovalentno veže α_2 - plazminski inhibitor na fibrin in tako dodatno zaščiti nastali fibrinski strdek. Na ta način je nastali

fibrinski strdek bolj stabilen in deloma zaščiteno pred prezgodnjo encimsko razgradnjo. FXIII pa sodeluje tudi v angiogenezi, celjenju ran, vzdrževanju nosečnosti, vnetnem odgovoru, regulira prirojeni in pridobljeni imunski odgovor, ... Zaradi vseh teh funkcij lahko FXIII imenujemo tudi molekularni kirurg, ki ohranja in rešuje endotelno bariero.

Gen za verigo A FXIII se nahaja na kromosomu 6, za verigo B pa na kromosomu 1. Zaradi različne funkcije verig A in B FXIII, ko veriga B deluje kot prenašalna molekula, veriga A pa katalitična, je klinična slika ob pomanjkanju verige B večinoma milejša, kot ob pomanjkanju verige A. Identificiranih je bilo že 197 genetskih variant v genih za *FXIII*, 172 genetskih variant je bilo določenih v genu, ki kodira verigo A in 25 v genu, ki kodira verigo B. Veriga A se sintetizira v megakariocitih, placenti, maternici in makrofagih, veriga B pa se sintetizira v hepatocitih. Razpolovna doba FXIII v krvni plazmi je 9 do 14 dni. Ob aktivaciji FXIII se verige A in B ločijo in nastane FXIIIa, ki katalizira kovalentno povezavo gama in alfa fibrinskih verig.

Dedno pomanjkanje FXIII je zelo redka (1:2,000,000), avtosomalno recesivna motnja. Posamezniki z heterozigotnim pomanjkanjem FXIII, so običajno asimptomatski. Večina bolnikov ima mutacijo v verigi A. Prvi klinični znak pomanjkanja FXIII, je običajno krvavitev iz popkovine, pogoste pa so tudi intrakranialne krvavitve, ki so lahko spontane, ali pa posledica le manjših poškodb. Se pa pri posameznikih s pomanjkanjem FXIII pojavljajo tudi druge motnje v strjevanju krvi, kot je prekomerno nastajanje modric, intramuskularne in subkutane krvavitve, hemoartroza, prekomerne menstrualne krvavitve,... Pri pomanjkanju FXIII poročajo tudi o upočasnjem celjenju ran in težavah v nosečnosti s ponavljajočimi spontanimi splavi, kar kaže na zelo raznolike funkcije FXIII. Pri večini bolnikov z aktivnostjo FXIII nižjo kot 0,05 E / ml (5 %) se pojavljajo krvavitve. Resnost krvavitve dobro korelira s plazemsko ravnjo FXIII.

Pridobljeno pomanjkanje FXIII (raven FXIII med 0,20 – 0,70 E / ml (20 - 70 %)) je bolj pogosto kot prirojeno in je posledica povečane porabe (krvavitve ob večjih operacijah ali poškodbah, ter izgub ob obsežnih opeklinah), zmanjšane sinteze (bolezni kostnega mozga (veriga A) ali bolezni jeter (veriga B)) ali pa pojava specifičnih protiteles (inhibitorjev) proti FXIII. Pri bolnikih s hudimi poškodbami, ki imajo raven FXIII pod mejo referenčnega območja se opaža večjo porabo krvnih preparatov, kot pri poškodovancih, ki imajo raven FXIII v mejah referenčnega območja. Zato je znižana raven FXIII indikacija za uporabo nadomestkov FXIII pri bolnikih s hudimi poškodbami.

Za zdravljenje pomanjkanja FXIII se lahko uporablja sveže zmrznjena plazma, krioprecipitat, koncentrat FXIII ali rekombinantni FXIII.

Raven faktorja XIII določamo laboratorijsko v citratni plazmi. V preteklosti so pomanjkanje FXIII ugotavljali s preiskavo 'Raztapljanje fibrinskega strdka - Clot solubility test', ki pa se danes ne uporablja več. Ta test bazira na opažanju, da fibrinski strdek ni topen v 5 M sečnini ali 1 % monoklorocetni kislini, ob pomanjkanju FXIII pa je. Težavo predstavljajo zelo slaba občutljivost in specifičnost te preiskave, ki zazna le hudo pomanjkanje FXIII in lahko močno podceni pomanjkanje FXIII. Test tudi ni standariziran. Sodobne metode za določitev FXIII so avtomatizirane in standarizirane in nam omogočajo bodisi določitev koncentracije (antigena, običajno verige A) ali pa aktivnosti FXIII. Pomanjkanje FXIII lahko zaznamo tudi s tromboelastometrijo (Rotem), kjer se opaža zmanjšan nastanek strdka in pospešena fibrinoliza, pri tej preiskavi pa ne moremo določiti ravni FXIII. Tromboelastometrija le nakaže na možno pomanjkanje FXIII.

V laboratoriju SHL določamo aktivnost FXIII s kromogeno metodo z reagenčnim kompletom Berichrom FXIII na analizatorju Sysmex CS-2500. Metoda je avtomatizirana, dobro standarizirana, hitra (meritev traja približno 10 min), ponovljiva, a slabo občutljiva (meja občutljivosti je 0,05 E / ml (5,0%)). Omejitve metode so koncentracija fibrinogena pod 0,8 g in nad 6,0 g / l, ter koncentracija amonijaka nad 0,5 mmol /L. Okvirne referenčne vrednosti so 0,70 - 1,40 E / ml (70

- 140 %). Merilno območje naše metode je med 0,05 - 1,50 E / ml (5,0 - 150 %). Preiskavo izvedemo v plazmi, ki jo pripravimo iz venske krvi odvzete v epruveto z Na-citratom.

Pojav protiteles proti FXIII je izredno redek (~100 poročanih primerov). 50 % primerov je idiopatskih, 50 % je posledica avto-imunih bolezni, solidnih tumorjev, mielo in limfoproliferativnih novotvorb, uporabe nekaterih zdravil in nosečnosti. Pojav protiteles proti FXIII je pogostejši pri starejših bolnikih. Protitelesa povzročajo močno znižane ravni FXIII in posledično močne krvavitve. Protitelesa proti FXIII so lahko nevtralizirajoča ali pa ne - nevtralizirajoča. Prisotnost nevtralizirajočih protiteles proti FXIII določamo z mešalnimi testi, ko plazmi bolnika dodamo normalno plazmo in izmerimo raven FXIII. Prisotnost ne - nevtralizirajočih protiteles pa se določa z ELISA metodami.

Literatura

1. Dorgalaleh A, The History of Factor XIII Deficiency, Semin Thromb Hemost 2024;50:34-42
2. Schroeder V in Kohler H P, New developments in the area of factor XIII, J Thromb Haemost 2013; 11: 234-44.
3. Schroeder V, Laboratory Assessment of Coagulation Factor XIII, Hämostaseologie 2020;40:467-471.
4. Duque D in Korte W, Factor XIII in the Acute Care Setting and Its Relevance in Obstetric Bleeding, Transfus Med Hemother. 2022; 50(1):10-17

Redke bolezni (ZHS)

Langerhansova histiocitoza in Erdheim-Chesterjeva bolezen

Tereza Urdih, Matjaž Sever

Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana

tereza.urdih@kclj.si

Uvod

Langerhansova histiocitoza (LCH) in Erdheim-Chesterjeva bolezen (ECD) sodita v skupino histiocitoz, kroničnih vnetnih mieloproliferativnih novotvorb, za katere je značilna granulomatozna infiltracija tkiva s histiociti (monociti, makrofagi, dendritičnimi celicami) in vnetnimi celicami. Sta redki bolezni, ki se med seboj lahko prekrivata. Za LCH navadno zbolijo 1-1,5 na 1.000.000 prebivalcev, še redkejša je ECH, do sedaj je bilo v literaturi opisanih nekaj več kot 800 primerov. Večinoma prizadene moške srednje starosti, pojavi pa se tudi pri otrocih. V skupino histiocitoz sodijo še Rosai-Dorfmanova bolezen (RDD), maligna histiocitoza (MH), hemofagocitna limfocitna histiocitoza in prirojeni sindrom aktiviranja makrofagov ter različne kutane in subkutane oblike, kamor sodi juvenilni ksantogranulom (JXG). Bolezni se med seboj lahko prekrivajo, visoka je tudi incidenca pridruženih malignomov – predvsem mieloidnih novotvorb, limfomov, raka pljuč, ledvic ali ščitnice. Potek bolezni in klinična slika sta različni, simptomi so velikokrat raznoliki in neznačilni, prizadet je lahko praktično vsak organ ali več organskih sistemov hkrati. Diagnozo tako lahko ugotovimo šele več mesecev ali let po pojavu simptomov.

Etiologija bolezni še ni dokončno raziskana, znana pa je pot aktivacije preko mitogensko aktivirane protein kinazne (MAPK) poti, ki jo sestavljajo geni RAS-RAF-MEK-ERK, ki so vključeni v celično rast, proliferacijo, diferenciacijo in preživetje celice. Najpogostejša med njimi je mutacija BRAF-V600E. Ta je bila kot protoonkogen prepoznana že pri malignem melanomu, papilarnem karcinomu

ščitnice in dlakastocelični levkemiji. Določitev mutacij omogoča tarčno zdravljenje s kinaznimi inhibitorji. BRAF je pri LCH pozitivna pri 55%, pri ECH pa pri 50% bolnikov.

Klinična slika

Klinična slika je pestra, simptomi se pogosto prekrivajo, prizadet je lahko praktično vsak organ ali tkivo. Ločimo enosistemsko obliko, kjer je prizadet le en organ ali tkivo, ali večsistemsko obliko. Največkrat so prizadete kosti, pri ECD je značilna simetrična osteoskleroza metafiz dolgih kosti, pri LCH litične lezije lobanje, medenice in vretenc. Izolirana prizadetost pljuč je največkrat tipično povezana s kroničnim kadilstvom in v večini primerov spontano izzveni po prenehanju kajenja. Najznačilnejša endokrina motnja pri obeh tipih histiocitoze je diabetes insipidus zaradi infiltracije posteriorne hipofize. Tudi nevrodegenerativne spremembe niso redke, kažejo se s cerebelarnimi znaki, kognitivnim upadom. Za ECD so značilne ksantelazme vek, infiltracija v retroperitoneju, ob večjih žilah ob ledvicah in aorti, kar lahko vodi v ledvično in srčno popuščanje. Pojav citopenij, hepatosplenomegalija in hepatopatija pomenijo prizadetost kostnega mozga, jeter in vranice, kar nakazuje na agresivnejšo obliko sistemske bolezni.

Diagnostika

Pri vseh bolnikih opravimo laboratorijske preiskave s krvno sliko in DKS, biokemične preiskave s hepatogramom, kazalniki vnetja, pregled hipotalamo-hipofizne osi (rastni hormon, gonadotropin, tirotropin, kortikotropin, prolaktin, estradiol). Glede na visoko koincidenco za pridružene mieloične novotvorbe so priporočene tudi preiskave kostnega mozga, predvsem ob nepojasnjenih citopenijah ali citozah. Najpomembnejša slikovna diagnostična preiskava je FDG PET-CT za oceno razširjenosti bolezni in določitev metabolno najbolj aktivne lezije, ki bi bila najbolj primerna za histološko oceno. Biopsija prizadetega tkiva in molekularno genetske preiskave za mutacijo BRAF V600E in druge mutacije MAPK-ERK signalnih poti (z NGS) so namreč ključne pri postavitvi diagnoze. Histološko prepoznamo značilne granulomatozne lezije histiocitov (CD1a+, CD207+ (langerin), S100+, Birbeckove granule pri LCH in CD68+, CD163+, faktor XIIIa+ in fascin pri ECD) in vnetnih celic.

Glede na prizadetost organov je potrebno opraviti dodatno diagnostiko s CT in MRI, npr. MRI glave ob diabetes insipidusu ali infiltraciji hipotalamus-hipofizne osi; teste pljučne funkcije in HRCT ob pljučnih infiltratih, MRCP ali ERCP ob holestazi za izključitev skerozantnega holangitisa, ... Pri dokončni postavitvi diagnoze je potrebna klinična, radiološka, histološka in molekularno diagnostična povezava.

Zdravljenje

Izbira zdravljenja je odvisna od razširjenosti bolezni in prizadetosti organov. Asimptomatske bolnike lahko le spremljamo, lokalizirane lezije lahko zdravimo kirurško in z radioterapijo. Ker pa bolezen v veliki večini odkrijemo v razširjeni obliki, je potrebno sistemsko zdravljenje. Pri zdravljenju je izredno pomembna določitev MAPK-ERK mutacij, saj imamo na voljo tarčno zdravljenje z BRAF inhibitorji, kot sta vemurafenib (960 mg p.o. 2x / dan) in dabrafenib, ter MEK inhibitorji, cobimetinib (60 mg p.o. 21 dni / 28 dni) in trametinib, ki prideta v poštev predvsem pri tistih z odsotno BRAF mutacijo oz. potrjeno drugo mutacijo v MAPK-ERK poti (ARAF, KRAS, NRAS ali MAP2K1 mutacijo). Odgovori na zdravljenje so odlični, remisija bolezni je dosežena v več kot 85%. Kot glavni neželeni učinki se pojavijo artralgijska, utrujenost, driska, povišanje jetrnih encimov in kožne spremembe, ki lahko napredujejo tudi do ploščatoceličnega karcinoma.

Najbolj uporabljena in uveljavljena terapija pa je še vedno pegiliran interferon alfa (135 – 180 mcg s.c. / 7dni), ki je povezan z določenimi sopojavi in pričakovanim 50-80 % odgovorom. Kemoterapiji s kladribinom (0,14 mg / kg i.v. ali s.c. ali 5 mg / m² 5 dni vsakih 28 dni za 6 ciklov) ali citarabinom (100 mg / m² s.c. ali i.v. 5 dni vsakih 28 dni 1 leto) sta preizkušeni in varni, bolniki imajo še največ težav zaradi citopenij in okužb. V primeru neodzivnosti na zdravljenje ali ponovitve bolezni se v drugi liniji zdravljenja uporablja tudi antagoniste IL6 (tocilizumab), TNFalfa (infliksimab, etanercept), druge kinazne inhibitorje (imatinib) ali imunosupresive (prednizon, metotreksat, sirolimus). Odgovor na zdravljenje ocenjujemo s FDG PET-CT vsake 3 mesece, po doseženem metabolnem odgovoru lahko ta interval podaljšujemo na 6 do 12 mesecev.

V preteklosti smo zdravili s kombinacijo kortikosteroidov in kemoterapije z vinblastinom, tudi metotreksatom, vendar se je tako zdravljenje izkazalo manj uspešno kot pri otrocih, predvsem na račun prekinitev zaradi toksičnosti.

Naše izkušnje

Na KO za hematologijo, UKC Ljubljana, smo do danes obravnavali 36 bolnikov z LCH ali ECD. Večina bolnikov, ki je potrebovala zdravljenje, je prejela uveljavljene terapije z interferonom, kladribinom, citarabinom, sprva pa tudi vinblastinom v kombinaciji z drugimi zdravili. V zadnjih letih pa smo z odobritvijo ZZS v drugo linijo in višje linije uvedli zdravljenje z vemurafenibom in cobimetinibom. Bolniki so zdravljenje dobro sprejeli. Zdravili smo tri bolnike z vemurafenibom in dva bolnika s cobimetinibom. Sopotjavi, ki so zahtevali prilagoditev odmerka zdravila, so bili predvsem kožni. V primeru odpovedi oz. neuspešnosti vemurafeniba, smo dosegli odgovor s cobimetinibom. Pri enem bolniku je prišlo do smrti zaradi pojava nevrološke bolezni. Uspešnost zdravljenja smo pri vseh bolnikih spremljali s PET-CT. Potrebno bo proučiti možnosti zdravljenja teh bolnikov po odpovedi novih terapij.

Zaključek

LCH in ECD sta redki bolezni, ki zaradi svoje raznolikosti klinične prezentacije privedeta do pozne ugotovitve bolezni. Preiskava s PET-CT je postala standard pri spremljanju napredovanja oz. odgovora na zdravljenje. Zdravljenje je prilagojeno vsakemu bolniku posebej in obsega uveljavljene citostatike in interferon. V zadnjih letih smo uspešno uvedli zdravljenje z BRAF in MEK inhibitorji, vemurafenibom in cobimetinibom. Izkušnje so zaenkrat pozitivne, potrebno pa bo proučiti možnosti zdravljenja bolnikov po odpovedi navedenih oblik zdravljenja.

Literatura

1. Goyal G., Heaney L. M., Collin M., Cohen-Aubart F., Vaglio A., Durham H. B. et al. Erdheim-Chester disease: consensus recommendations for evaluation, diagnosis, and treatment in the molecular era. *Blood* 2020; 135 (22): 1929–1945
2. Goyal G, Tazi A, Go RS, Rech KL, Picarsic JL, Vassallo R, et al. International expert consensus recommendations for the diagnosis and treatment of Langerhans cell histiocytosis in adults. *Blood*. 2022 Apr 28;139(17):2601-2621
3. Šajin M,, Sever M. Dan redkih boleznj 2020; 2020 Mar 3; 68-72.
4. Gulati, N. and Allen, C.E. (2021), Langerhans cell histiocytosis: Version 2021. *Hematological Oncology*, 39: 15-23
5. Geerlinks AV, Abla O. Treatment of Langerhans Cell Histiocytosis and Histiocytic Disorders: A Focus on MAPK Pathway Inhibitors. *Paediatr Drugs*. 2023 Jul;25(4):399-409.
6. McClain, K.L., Bigenwald, C., Collin, M. et al. Histiocytic disorders. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 Oct 7; 7:73.
7. Jean-François E., Cohen-Aubart F., Collin M., Fraitag S., Idbaih A., Abdel-Wahab O. et al. Histiocytosis. *The Lancet*, Volume 398, Issue 10295, 2021 Jul 10; 157 - 170 .

Hematološke novotvorbe ob sistemski mastocitozi

Mojca Dreisinger, Nejc Pulko

Oddelek za hematologijo in hematološko onkologijo, Univerzitetni klinični center Maribor

mojca.dreisinger@ukc-mb.si

Uvod

Mastocitoza je skupina redkih boleznih, za katere je značilna razrast mastocitov v tkiva. V kolikor se mastociti razraščajo zgolj v koži, govorimo o kožni mastocitozi, ki je pri odraslih redko (< 5%) edina manifestacija bolezni. Za sistemsko mastocitozo (SM) je značilno razraščanje mastocitov poleg kože še v drugih organih, najpogosteje v kostnem mozgu. Klinična slika je na eni strani posledica infiltracije in prizadetosti organov, na drugi strani sproščanja aktivnih snovi (histamin, triptaza, levkotrieni, heparin, idr.) iz granul mastocitov. Sproščanje aktivnih snovi lahko sprožijo okužbe, stres, piki kožekrilcev, pikantna hrana, operativni posegi, idr., kar lahko vodi v vazodilatacijo, hipotenzijo, diarejo, rdečico kože in anafilaktično reakcijo. Infiltracija organov se kaže s pojavom citopenij, splenomegalije, hepatopatije, osteoporoze, malabsorpcije in kožnih izpuščajev.

Gre za redke bolezni, prevalenca vseh oblik je 1/10.000 prebivalcev. Razlikujemo več tipov mastocitoze (*tabela 1*), ki imajo različno klinično sliko in potek. Najpogostejša SM je indolentna sistemsko mastocitoza. Med napredovale oblike SM z najslabšo prognozo sodijo agresivna SM, mastocitna levkemija in SM s pridružno hematološko novotvorbo (SM-PHN), slednja predstavlja 60-70% vseh napredovalih oblik SM.

kožna mastocitoza

- urticaria pigmentosa/makulopapularna kožna mastocitoza
- difuzna kožna mastocitoza
- kožni mastocitom

sistemska mastocitoza

- indolentna sistemska mastocitoza
- mastocitoza kostnega mozga
- tleča sistemska mastocitoza
- sistemska mastocitoza s pridružno hematološko (mieloidno) novotvorbo
- agresivna mastocitoza
- mastocitna levkemija

mastocitni sarkom

Tabela 1. Razdelitev mastocitoz.

Diagnozo SM lahko postavimo, ko sta izpolnjena glavno diagnostično merilo in vsaj 1 pomožno ali ≥ 3 pomožna merila (*tabela 2*). Za postavitev diagnoze je potrebna histopatološka preiskava kostnega mozga, redkeje prizadetega organa. Ključna je tudi določitev mutacije *c-KIT*, najpogostejša je *KIT D816V*, v < 5% so možne tudi mutacije izven eksona 17.

Glavno diagnostično merilo

Multifokalni infiltrati mastocitov (≥ 15 mastocitov v agregatih) v kostnem mozgu in/ali drugih izvenkožnih organih

Pomožna diagnostična merila

1. V biopsiji kostnega mozga ali drugega izvenkožnega organa: $>25\%$ mastocitov v infiltratih je atipičnih.
 2. potrjena KIT mutacija kodona 816 (*KIT* D816V) v kostnem mozgu, periferni krvi ali drugem izvenkožnem organu.
 3. Mastociti v kostnem mozgu, krvi ali drugih izvenkožnih organih izražajo CD25 in/ali CD2 in ali CD30.
 4. Serumska triptaza >20 ng/mL (razen v primerih, ko obstaja pridružena hematološka novotvorba).
-

Tabela 2. Diagnostična merila za sistemsko mastocitozo. Diagnoza je postavljena, če je izpolnjeno glavno diagnostično merilo in vsaj 1 pomožno ali ≥ 3 pomožna merila.

Sistemska mastocitoza s pridruženo hematološko novotvorbo

Po različnih podatkih je 20-40% SM pridruženih hematološki novotvorbi, v večini primerov gre za mieloidno pridruženo neoplazmo, zato so po novi mednarodno sprejeti klasifikaciji (ang. ICC – International Consensus Classification) ime spremenili v SM s pridruženo mieloidno neoplazmo. Najpogosteje gre za mieloproliferativno obolenje ($\approx 40\%$), kronično mielomonocitno levkemijo ($\approx 30\%$), mielodisplastični sindrom ($\approx 20\%$) ali akutno mieloično levkemijo. Redki so opisani primeri, ko gre za pridruženo SM limfomu, diseminiranemu plazmocitomu ali kronični limfocitni levkemiji. Za postavitev diagnoze veljajo enaka diagnostična merila kot so opisana predhodno (*tabela 2*),

vendar morajo bolniki izpolnjevati tudi kriterije za hematološko novotvorbo, za slednjo so ključne biopsija kostnega mozga in dodatne molekularno-citogenetske metode.

Raven serumske triptaze je lahko povišana pri bolnikih z dedno alfa triptazemijo in s hematološko boleznijo (brez SM), zato je kot kriterij izvzet oz. nezanesljiv. Prav tako so različice mutacij *c-KIT* prisotne pri tretjini bolnikov z akutno mieloično levkemijo, kar ne pomeni, da imajo bolniki pridruženo SM.

Zdravljenje

Bolniki s SM-PHN lahko imajo simptome in klinično sliko zaradi SM ali zaradi ne-mastocitne hematološke bolezni. Za nadaljnjo obravnavo ter zdravljenje bolnikov je pomembno, da razlikujemo, katera bolezen bolnika bolj ogroža oz. mu povzroča več simptomov. Jasnih kliničnih smernic ni, odločati se je potrebno na individualni ravni in pri tem upoštevati breme ter prognozo PHN. Priporočeno je, da zdravimo PHN kot bi jo zdravili, če bolnik ne bi imel pridružene SM in obratno. Seveda obstajajo primeri, ko lahko s specifičnim zdravljenjem zdravimo obe bolezni hkrati, kot je to pri FLT3 pozitivni akutni mieloični levkemiji z midostaurinom, pegiliranim interferonom pri mieloproliferativnih obolenjih ali kladribinom pri dlakastocelični levkemiji.

Simptomatsko in podporno zdravljenje SM je enako, kot če bolnik ne bi imel PHN. Bolniki morajo imeti samoinjektor adrenalina. V kolikor so imeli anafilaktično reakcijo ob piku žuželke, je smiselna imunoterapija s strani alergologov. Ob srbečici kože predpisujemo H1 antagoniste, ob gastrointestinalnih simptomih zaviralce protonskih črpalk, ob osteopeniji lahko bolniki prejemajo bisfosfonate za preprečevanje osteoporotičnih zlomov. Merila za začetek citoreduktivnega zdravljenja SM so enaka kot pri ostalih napredovalih SM. Najboljši nadzor simptomov ter bolezni dosežemo s tirozin kinaznimi zaviralci. Nekaj let že imamo na voljo midostaurin, na novo imamo možnost zdravljenja s selektivnejšim KIT zaviralcem avapritinibom. V kolikor ni prisotna *c-KIT* mutacija, se lahko poslužujemo zdravljenja z imatinibom. Pri kožni simptomatiki in kostni prizadetosti je možno zdraviti tudi s pegiliranim interferonom, vendar je ob začetku zdravljenja priporočen dodatek kortikosteroidov za preprečevanje morebitne anafilaksije.

Kot edino možno ozdravitev napredovale SM še vedno predstavlja alogenska presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC), ki je še posebej primerna pri nekaterih PHN, kot je akutna mieloična levkemija, kronična mielomonocitna levkemija in mielodisplastični sindrom s presežkom blastov. Pri napredovalih SM je največ izkušenj z alogensko PKMC ravno v skupini s SM-PHN, kjer je bila PKMC izvedena zaradi ne-mastocitne hematološke bolezni. Tudi preživetje in uspehi zdravljenja z alogensko PKMC so pri tej skupini bolnikov boljši kot pri mastocitni levkemiji ali agresivni SM.

Prognoza

Bolniki s SM-PHN imajo slabo prognozo, mediana preživetja je zgolj 2 leti. Za samo prognozo je pomembna PHN, ki je pridružena SM. Najkrajše preživetje je pri bolnikih z akutno mieloično levkemijo in mielodisplastičnim sindromom, najboljšo prognozo imajo bolniki s pridruženim mieloproliferativnim obolenjem. Obstaja več prognostičnih modelov, nekateri upoštevajo kot neugoden dejavnik dodatne molekularne najdbe (mutacija *ASXL1*, *NRAS*, *RUNX1*), ki pomenijo tudi slabši odgovor na zdravljenje s tirozin kinaznimi zaviralci.

Zaključek

SM je redka bolezen, v večini gre za indolentne oblike, ki potrebujejo zgolj podporno zdravljenje za obvladovanje simptomov in preprečevanje anafilaktičnih reakcij. Prognoza bolnikov z napredovalo SM se je ob pojavu novih tirozin kinaznih zaviralcev (še posebej avapritiniba) močno izboljšala. Največji izziv ostaja zdravljenje bolnikov s SM-PHN, kjer je potek bolezni večinoma odvisen od pridruženega hematološkega obolenja in kjer dodatne mutacije pomenijo rezistenco na novejša zdravila.

Literatura:

1. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2023 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol.* 2023; 98(7): 1097-1116.

2. Castells MC, Akin C. Mastocytosis (cutaneous and systemic) in adults: Epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and diagnosis. UpToDate, dostopno 30.3.2024.
3. KOŠNIK, Mitja (editor). *Mastocitoza v alergologiji : zbornik sestanka: skupni sestanek Alergološke in imunološke sekcije SZD z Združenjem hematologov Slovenije: petek, 5. marec 2021*. Ljubljana: Alergološka in imunološka sekcija SZD, 2021. 42 str.
4. Gilreath JA, Tchertanov L, Deininger MW. Novel approaches to treating advanced systemic mastocytosis. *Clin Pharmacol*. 2019 Jul 10;11:77-92.
5. Lee HJ. Recent advances in diagnosis and therapy in systemic mastocytosis. *Blood Res*. 2023 Apr 30;58(S1):96-108.
6. Gotlib J. Advanced systemic mastocytosis: Management and prognosis. UpToDate, dostopno 30.3.2024.

Nova zdravila pri zdravljenju PNH

Karla Rener, Irena Preložnik Zupan

Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana

Karla.rener@kclj.si

UVOD

Paroksizmalna nočna hemoglobinurija (PNH) je redka nemaligna klonška hematološka bolezen za katero je značilno pomanjkanje regulatorjev komplementa, vezanih na glikozil fosfatidil inozitolno sidro (GPI) na membrani krvotvornih celic, zaradi česar so te dovzetne za poškodbe, ki jih povzroča komplement. Z odkritjem inhibitorja C5 komponente komplementa, ekulizumaba, smo leta 2007 prejeli prvo možnost zdravljenja te bolezni. Navkljub blokadi C5 komponente komplementa nekateri bolniki utrpijo t.i. prebojne hemolize (BTH, ang. break-through hemolysis), ki se klinično kažejo z nenadno makroskopsko hemoglobinurijo in simptomi poslabšanja anemije. Zato so znanstveniki poleg inhibitorjev C5 (ekulizumab, ravulizumab) razvili nove molekule, ki zavirajo komplement v proksimalnem delu, nad skupno potjo. Novi inhibitorji komplementa so usmerjeni na komponento C3, faktor B in D. Uporaba inhibitorjev komplementa se širi tudi na področje ostalih bolezni, ki so povezane s prekomerno aktivacijo le te-ga: atipični hemolitično uremični sindrom, bolezni hladnih aglutininov, trombotična mikroangiopatija po presaditvi krvotvornih matičnih celic, refraktarna generalizirana miastenija gravis, specifična oblika nevromielitisa vidnega živca, C3 glomerulopatija.

KOMPLEMENT

Komplement ima v telesu pomembno imunsko vlogo, saj skrbi za obrambo proti mikrobom, odstranjuje celični debris in odmrle celice. Aktivacija komplementa sproži nastanek številnih vnetnih mediatorjev med njimi anafilatoksinov. Ti vplivajo na kemotakso, aktivacijo številnih celic (endotelnih in drugih celic, ki so vključene v imunski odziv), vplivajo na kontrakcijo gladkih mišic,

na dilatacijo žil. Komplement sodeluje tudi pri odstranjevanju imunskih kompleksov, v angiogenezi, mobilizaciji matičnih celic in regeneraciji tkiv. Sestoji iz treh poti in sicer klasične, alternativne in lektinske poti. Celokupno vključuje preko 50 beljakovin in je natančno in kompleksno uravnavan sistem v telesu. Alternativna pot sodi med najstarejše prirojene obrambne imunske sisteme, ki za svojo aktivacijo ne potrebuje prisotnosti protiteles ali lektina. Je vseskozi blago aktivna in vodi v nastanek C3b, ki pa se hitro razgradi v prisotnosti regulatorjev na zdravih tkivih in celicah. V primeru okužbe se njeno delovanje ojača preko klasične poti, katere aktivacija je odvisna od prisotnosti imunoglobulinov vezanih na antigene mikrobov. Končni rezultat aktivacije je nastanek MAC (ang. membrane attack complex). MAC poruši celovitost celične membrane in vodi v propad mikroorganizma ali celice. Patološko se lahko aktivira tudi v primeru avtoimunih bolezni. Prekomerno aktivacijo komplementa fiziološko preprečujejo na membrano vezani ali topni regulatorni proteini, ki uravnavajo komplement. Ti imajo pomembno vlogo pri patogenezi s komplementom posredovanih bolezni.

PNH

Paroksizmalna nočna hemoglobinurija (PNH) je redka nemaligna klonška hematološka bolezen za katero je značilno pomanjkanje regulatorjev komplementa, vezanih na GPI na membrani krvotvornih celic, zaradi česar so te dovzetne za poškodbe, ki jih povzroča komplement. Intravaskularna hemoliza (IVH), močno povečana nagnjenost k trombozam in odpoved kostnega mozga so značilnosti bolezni in so povezane z visoko obolevnostjo in umrljivostjo. Pridobljena somatska mutacija mostičkov/sidrišč PIG-A vodi v pomanjkanje regulatorjev komplementa na vseh celicah, ki se razvijejo iz prizadete matične celice. Na površini imajo odsotno beljakovino CD55 (ang. DAF-Decay Accelerating Factor) in CD59 (ang. MIRL- Membrane Inhibitor of Reactive Lysis). Pri nastanku MAC ključno sodeluje C5 komponenta (terminalna del kaskade). Ob uporabi C5 inhibitorja eritrocite zaščitimo pred z MAC posredovano intravaskularno hemolizo, vendar pomanjkanje CD55 povzroči aktivacijo proksimalnega dela komplementa z nenadzorovano aktivnostjo C3 konvertaze. Aktivacija komplementa proksimalno vodi v C3b posredovano opsonizacijo in fagocitozo eritrocitov. Tako pride do ekstravaskularne hemolize (EVH). To pomeni, da se navkljub terapiji še vedno lahko pojavlja tako blaga IVH kot EVH zaradi česar je pomemben

delež bolnikov anemičen in nekateri ostanejo odvisni od transfuzije. Zaplet predstavljajo tudi farmakokinetične (prenizek odmerek zdravila) in farmakodinamične (ob močni aktivaciji komplementa, npr. v primeru okužb) prebojne hemolize (BTH, ang. break-through hemolysis). Blokada C3 komponente (proksimalnega dela komplementa) lahko vodi v bistveno boljši nadzor bolezni s popolno korekcijo anemije, vendar je delež PNH eritrocitov v krvi tako velik, da pride v primeru t.i. BTH do hude anemije, celo do urgentnega stanja.

Za bolezen so značilni simptomi utrujenosti, simptomi povezani z anemijo. Distonija gladkih mišic in vazokonstrikcija žilja vodita do krčev požiralnika in disfagijo, pojavljajo se bolečine v trebuhu ali hrbtu ter erektilna disfunkcija. Tem se pridružijo simptomi, povezani s trombozo in/ali ishemijo ter pojavi zlatenice in očitne hemoglobinurije. Pri bolnikih lahko pride tudi do odpovedi ledvic, pljučne hipertenzije ali drugih sekundarnih posledic, kot so Budd-Chiarijev sindrom, če PNH ne prepoznamo dovolj zgodaj. PNH namreč sodi med najbolj trombogena stanja. Simptomi se lahko poslabšajo ob okužbah, operativnih zdravljenji, po cepljenju ali ob drugih komplement stimulirajočih dejavnikih.

ZDRAVLJENJE

V zadnjih 20 letih je zdravljenje PNH temeljilo na inhibiciji terminalnega dela komplementa s protitelesi. Zdravilo ekulizumab je bilo odobreno leta 2007, od 2019 pa je na voljo ravulizumab, prav tako monoklonsko protitelo, ki inhibira C5 komponento komplementa vendar z daljšo razpolovno dobo, kar omogoča aplikacijo na 8 tednov (namesto na 14 dni). Zdravilo apliciramo intravenozno. Odkritje inhibitorja komplementa C5, ekulizumaba, ki zavre komplement v terminalnem delu, je vodilo v njegovo takojšnjo uporabo pri PNH bolnikih. Nadzor končne kaskade aktivacije komplementa in s tem preprečevanje intravaskularne hemolize (IVH), je bilo prelomno in je pomembno spremenilo življenje bolnikom s PNH. Prvi bolniki so bili v sklopu kliničnih raziskav zdravljeni v letu 2002. Petletno preživetje bolnikov s PNH se je povečalo iz 30 % na približno 97 %. Bolniki so pred tem umirali predvsem zaradi trombotičnih zapletov. Zaviranje komponente komplementa C5 z ekulizumabom je postalo standard zdravljenja v državah, kjer je bilo zdravilo na voljo. Vendar so nekateri bolniki zaradi vztrajanja blage IVH in novo nastale EVH ter BTH ostajali

anemični. Tako so bili razviti inhibitorji proksimalnega dela komplementa. Prvo tovrstno zdravilo, pegcetacoplan, usmerjeno na C3 komponento, je bilo odobreno leta 2021. Je prvo zdravilo, ki ga lahko apliciramo v obliki podkožne injekcije/kratke infuzije. V razvoju so inhibitorji faktorja B (proksimalni del komplementa), med njimi pričakujemo prvo peroralno zdravilo iptakopan. V razvoju so inhibitorji faktorja D, ki prav tako sodeluje v proksimalnem delu komplementa (danikopan, vemirkopan). Možna bo dvojna inhibicija, terminalni in proksimalni del komplementa skupaj pri nekaterih bolnikih. Veča se tudi nabor inhibitorjev C5, ki jih bomo lahko aplicirali podkožno (krovalimab, ravulizumab, pozelimab, cemdiseran). V Sloveniji imamo na tržišču tudi že generično obliko ekulizumaba.

Za razumevanje prebojnih hemoliz ob novih zdravilih, je pomembno upoštevati vpliv zdravila na delež PNH eritrocitov v krvi. Zavora komplementa na ravni C5 prepreči, da bi PNH eritrociti šli v hemolizo, kar bistveno spremeni delež PNH eritrocitov v krvi. Pri nezdravljeni PNH ima lahko na primer bolnik raven Hb 70 g/L in od tega le 33 % PNH eritrocitov. Pojav BTH vodi v hemolizo tega, relativno majhnega deleža PNH eritrocitov. Če pri bolniku zavremo komplement proksimalno, na ravni C3, lahko pride do popolne korekcije anemije (Hb 140 g/L) vendar z 99 % prisotnostjo PNH eritrocitov. Ti so kar šestkrat bolj dovzetni za s komplementom posredovano hemolizo ob BTH. Tako se kljub impresivni terapevtski koristi blokade C3 oz drugih proksimalnih komponent komplementa lahko soočamo s hudimi BTH, ki lahko predstavljajo masivno hemolizo z življenje ogrožajočo anemijo. V takem slučaju je poleg podporne terapije s transfuzijami nujno takojšnje dodatno zdravljenje bodisi z inhibitorjem C5 ali dodatnim odmerkom inhibitorja C3.

Odziv na zdravljenje ocenjujemo s koncentracijo hemoglobina, potrebami po transfuzijah, ravno LDH in številom retikulocitov. Hkrati ocenjujemo stopnjo utrujenosti in sočasne simptome bolezni (bolečine, motnje požiranja, erektilno disfunkcijo). V ta namen so razvili vprašalnik FACIT/FATIG, ki ga imamo tudi v slovenskem jeziku.

Zdravljenje z inhibitorji komplementa povzroča oslabljen imunski odziv, kar se kaže s povečano nagnjenostjo h okužbah z enkapsuliranimi bakterijami, zlasti meningokoknimi. Pred uvedbo kateregakoli inhibitorja komplementa je potrebo bolnika cepiti proti *Neisserii meningitidis*, pa

tudi proti okužbi s *Streptococcus pneumoniae* in *Haemophilus influenzae*. Ker zaščita ni popolna moramo bolnike poučiti, da v primeru okužbe takoj poiščejo zdravniško pomoč in prejmejo antibiotično zdravljenje.

ZAKLJUČEK

PNH kot posledica motnje v regulaciji komplementa ostaja prototip bolezni, pri kateri odkrivamo kompleksnost našega naravnega imunskega sistema, komplementa. Na modelu PNH se razvijajo nove možnosti zdravljenja bolezni komplementa. Novi inhibitorji komplementa, ki delujejo na elemente proksimalne poti, predstavljajo dodatne možnosti zdravljenja zlasti za tiste PNH bolnike, ki so ob inhibiciji C5 ostali slabokrvni in odvisni od transfuzij. Vendar se ob teh zdravljenjih pojavljajo novi izzivi, zlasti v obliki obsežnih BTH, ki jih je potrebno pravočasno prepoznati in zdraviti.

Literatura

1. Gavriilaki E, de Latour RP, Risitano AM. Advancing therapeutic complement inhibition in hematologic diseases: PNH and beyond. *Blood*. 2022 Jun 23;139(25):3571-3582.
2. Schmidt CQ, Schrezenmeier H, Kavanagh D. Complement and the prothrombotic state. *Blood*. 2022 Mar 31;139(13):1954-1972..
3. Brodsky RA. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2021 Mar 11;137(10):1304-1309.
4. UpToDate. M Kathryn Liszewski, John P Atkinson. Overview and clinical assessment of the complement system. Feb 2024
5. Kulasekararaj AG, Lazana I. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Where are we going. *Am J Hematol*. 2023 May;98 Suppl 4:S33-S43.
6. Duval A, Frémeaux-Bacchi V. Complement biology for hematologists. *Am J Hematol*. 2023 May;98 Suppl 4:S5-S19.

Izkušnje zdravljenja z luspaterceptom

Jasmina Hauptman Faletič¹, Polona Novak²

¹ Oddelek za hematologijo in hematološko onkologijo, Univerzitetni klinični center Maribor

² Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana

jasmina.hauptmanfaletic@ukc-mb.si

UVOD

Cilj zdravljenja bolnikov z MDS z nizkim tveganjem je vzpostavitev normalne hematopoeze ter posledično zmanjšanje potrebe po transfuzijah krvi in izboljšanje kakovosti življenja. Terapija izbora bolnikov z MDS z nizkim tveganjem je do sedaj obsegala celične rastne faktorje, lenalidomid ter transfuzije krvnih komponent.

Luspatercept, učinkovina za dozorevanje eritrocitov je rekombinantni fuzijski protein, ki veže izbrane ligande superdružine transformirajočih rastnih faktorjev β (TGF- β). Z vezavo na specifične endogene ligande (npr. GDF-11, aktivin B) luspatercept zavira signalne poti Smad 2/3, kar omogoči dozorevanje eritrocitov z diferenciacijo eritroidnih prekursorjev (normoblastov) v kostnem mozgu. Signalizacija Smad 2/3 je neobičajno velika pri boleznih, za katere je značilna neučinkovita eritropoeza, tj. MDS in β -talasemija.

Luspatercept je indiciran za zdravljenje odraslih bolnikov z anemijo s prstanastimi sideroblasti/mutacijo SF3B1, pri katerih je potrebna transfuzija zaradi mielodisplastičnega sindroma (MDS) z zelo majhnim, majhnim do srednjim tveganjem in se premalo odzivajo ali se ne odzivajo na zdravljenje z eritropoetinom oz. ga ne prenašajo; pri odraslih z mielodisplastično/mieloproliferativno neoplazmo s prstanastimi sideroblasti ter trombocitozo (MDS/MPN – RS-T) ter za zdravljenje anemije, povezane z beta-talasemijo, odvisno ali neodvisno od transfuzije.

ŠTUDIJI MEDALIST TER COMMANDS

Klinična učinkovitost ter varnost zdravila je bila ocenjevana v multicentrični, dvojno slepi, s placebom nadzorovani študiji faze III MEDALIST, v katero je bilo vključenih 229 odraslih bolnikov, ki so glede na IPSS – R točkovnik bili opredeljeni v skupino z MDS s prstanastimi sideroplasti ($\geq 15\%$ oz. $\geq 5\%$ ob prisotni SF3B1 mutaciji in $\leq 5\%$ blastnih celic v kostnem mozgu) z zelo majhnim, majhnim ali srednjim tveganjem. 95% bolnikov, vključenih v študijo, je predhodno prejelo terapijo z eritropoetinom. Transfuzijsko neodvisnost za vsaj 8 tednov ali več (v opazovanih 24 tednih terapije) je v skupini s prejetim luspaterceptom doseglo 38% (58/153 bolnikov) bolnikov, v primerjavi s 13% (10/72 bolnikov) v placebo skupini. Omenjen učinek se je nadaljeval pri bolnikih, ki so odgovorili na terapijo, tudi po 25 tednu spremljanja. Hematološki odgovor (58% vs. 17%) je bil pomembno višji v skupini s prejetim luspaterceptom. Med bolniki, ki so se odzvali na zdravljenje z luspaterceptom, je bila mediana trajanja najdaljšega obdobja neodvisnosti od transfuzije eritrocitov 30,6 tednov. Odstotek transformacije v AML je bil enak med obema skupinama. Najpogostejši stranski učinki ob terapiji z luspaterceptom so bili utrujenost (27%), diareja (22%), slabost (20%); le 7 bolnikov (5%) je potrebovalo znižanje odmerka luspatercepta zaradi stranskih učinkov. Na podlagi omenjene študije sta tako FDA, kot EMA odobrili terapijo z luspaterceptom za predhodno omenjene indikacije.

Randomizirana študija faze III COMMANDS je bila prva študija, ki je primerjala učinkovitost ter varnost terapije z luspaterceptom v primerjavi s terapijo z epoetinom alfa pri bolnikih z MDS z nizkim tveganjem, ki predhodno niso prejeli terapije z eritropoetinom. Povprečno trajanje terapije z luspaterceptom je znašalo 42 mesecev (82% bolnikov je prejelo terapijo vsaj 24 tednov) v primerjavi z 27 meseci terapije pri bolnikih, zdravljenih z epoetinom alfa. Od 301 bolnikov, vključenih v analizo študije je 59% bolnikov (86/147 bolnikov), ki so prejeli luspatercept, postalo transfuzijsko neodvisnih za vsaj 2 tedna s sočasnim zvišanjem hemoglobina za več kot 15 g/l v prvih 24 tednih prejete terapije v primerjavi z 31,2 % (48/154 bolnikov) bolnikov v skupini s prejetim eritropoetinom alfa. Ob podaljšanem opazovanju (48 tednov) je 58% bolnikov (74/128 bolnikov) doseglo transfuzijsko neodvisnost 24 tednov ali več. Višji odstotek transfuzijske neodvisnosti so opazovali v skupini bolnikov z višjim odstotkom prstanastih sideroplastov ter s

pridruženo mutacijo v SF3B1 genu (70% vs. 42%) v skupini bolnikov na terapiji z luspaterceptom. 4 bolniki so tekom zdravljenja napredovali v MDS z visokim tveganjem (2,8%), 4 bolniki pa v akutno mieloično levkemijo (2,2%), progres je bil primerljiv med obema terapevtskima skupinama.

NAŠE IZKUŠNJE

Luspatercept je na voljo našim bolnikom od junija 2023. V Hematološki ambulanti v Ljubljani ga je prejelo 13 bolnikov. 2 nadaljujeta terapijo v UKC Maribor. 1 bolnik je zdravljenje zaključil zaradi poslabšanja vrtoglavice, tudi učinkovitost je bila slaba. 1 bolnik je zaključil zaradi neučinkovitosti. 1 bolnica je terapijo ravno pričela. Preostalih 8 bolnikov redno prejema luspatercept, večina v odmerku 1,75 mg/kg, ki je bil postopno dvignjen. V časovnem obdobju 4 mesecev pred uvedbo luspatercepta je bilo povprečno število enot koncentriranih eritrocitov 12 (3-16). Po uvedbi pa je povprečno število koncentriranih eritrocitov v 4 mesecih 3 enote (0-6). Ugotavljamo 75 % znižanje potreb po transfuzijskem zdravljenju. Manj prejetih transfuzij prejmejo tisti, ki so že prej imeli manjšo potrebo po transfuzijskem podpornem zdravljenju in imajo potrjen MDS z nizkim tveganjem s SF3B1 mutacijo. Najpogostejši stranski učinek je utrujenost, ki pa se večinoma po 3 mesecih terapije zmanjša v kolikor nima bolnik drugih pridruženih stanj, ki lahko povzročajo podobno klinično sliko. Pri mlajši bolnici smo ugotavljali tudi pomemben dvig krvnega tlaka, kar je možen stranski učinek. Ob znižanju odmerka se je stanje normaliziralo.

Podatki iz realne klinične prakse potrjujejo učinkovitost luspatercepta, ki je vidna v študijah. Na začetku zdravljenja je bolnikom potrebno poudariti utrujenost kot možen stranski učinek, ki pa je večinoma prehodna.

LITERATURA:

1. Germing U. et al. Improved benefit of continuing luspatercept therapy: sub-analysis of patients with lower-risk MDS in the MEDALIST study. *Annals of Hematology*. 2023

2. Fenaux P et al. Luspatercept in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 202
3. Khan S et al. Luspatercept in Low-Risk Myelodysplastic Syndrome: A Real-World Single Institution Case Series. *Clin Hematol Int* 4, 148–151 (2022).
4. Guillermo Garcia-Manero et al. Efficacy and safety results from the COMMANDS trial: A phase 3 study evaluating luspatercept vs epoetin alfa in erythropoiesis-stimulating agent (ESA)-naive transfusion-dependent (TD) patients (pts) with lower-risk myelodysplastic syndromes (LR-MDS).. *JCO* 41, 7003-7003(2023)
5. Platzbecker U et al. Efficacy and safety of luspatercept versus epoetin alfa in erythropoiesis-stimulating agent-naive, transfusion-dependent, lower-risk myelodysplastic syndromes (COMMANDS): interim analysis of a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet.* 2023 Jul 29;402(10399):373-385.

Hemofagocitna limfohistiocitoza ali prekomerno vnetje?

Klara Šlajpah, Polona Novak

KO za hematologijo, UKC Ljubljana

polona.novak@kclj.si

Primarni HLH

Hemofagocitna limfohistiocitoza (HLH) je pretiran imunski odziv, pogosto imenovan tudi "citokinski vihar". Običajno se imunski sistem po odpravi sprožilnega dejavnika deaktivira, pri HLH pa zaradi nezmanjšane aktivacije T limfocitov in makrofagov, pogosto s hkratno disfunkcijo celic naravnih ubijalk (NK), ostane aktiven.

Primarna HLH (pHLH) ki je običajno dedna in se kaže v zgodnjem otroštvu, vključuje mutacije, ki prizadenejo citotoksična zrnca v imunskih celicah, zaradi česar je oslABLJENO delovanje NK celic in citotoksičnih T limfocitov. Pogostost dedne HLH na Švedskem je ocenjena na 0,12/100.000 otrok, mlajših od 15 let, kar ustreza 1/50.000 živorojenih otrok. Čeprav se običajno pojavi pri otrocih, se dedna HLH lahko pojavi tudi pri odraslih, kot so dokazali na Japonskem, kjer je bilo 44 % primerov HLH pri osebah, starejših od 15 let, od tega 19 % pri starejših od 60 let.

Najpogosteje gre za avtosomno recesivno genetsko mutacijo v genih za delovanje citotoksičnih limfocitov T in NK celic (npr. PRF1, UNC13D, STX11, STXBP2 idr.). Poleg družinske HLH med pHLH sodijo motnje v dovzetnosti za virus Epstein-Barr, z lizosomi povezane pigmentne bolezni in X vezane limfoproliferativne bolezni. Diagnoza običajno temelji na merilih HLH-2004, ki vključujejo simptome, kot so vročina, splenomegalija in citopenije. Standardno zdravljenje, ki izhaja iz protokolov HLH-94 in HLH-2004, vključuje režim deksametazona in etopozida v kombinaciji s ciklosporinom. Pri tistih, pri katerih je potrjena družinska oblika bolezni ali pri katerih pride do ponovitve bolezni ali odpornosti na standardno zdravljenje, se priporoča alogenska presaditev krvotvornih matičnih celic, venar je pred tem potrebno doseči remisijo. Druga zdravila za pHLH

vključujejo alemtuzumab in antitimocitni globulin ter emapalumab, monoklonsko protitelo, usmerjeno proti IFN- γ . Podatki o uporabi novejših zdravil, kot so ruksolitininib, tocilizumab ali anakinra pri pHLH so omejeni, vendar je vedno več objav v zadnjem času, ki kažejo na učinkovitost omenjenih zdravil v 2. liniji zdravljenja. Če bolnikov z dedno HLH ne zdravimo, je mediana preživetja približno 2 meseca.

Hemofagocitni sindrom povezan z imunskimi efektorskimi celicami

CAR-T celice se aktivirajo, ko prepoznajo tumorske antigene, kar povzroči sproščanje citotoksičnih granul. To aktivira proliferacijo T limfocitov, kar vodi v sproščanje citokinov in posledično aktivacijo makrofagov, ki nato sproščajo dodatne topne dejavnike, s čimer se vnetni odziv dodatno širi. IEC-HS se lahko pojavi neodvisno od sindroma sproščanja citokinov (CRS) in sindroma nevrotoksičnosti, povezane z imunskimi efektorskimi celicami (ICANS). IEC-HS se običajno pojavi pozneje kot CRS, običajno 10-14 dni po infuziji CAR-T, včasih po prenehanju CRS. Zaradi izzivov pri diagnosticiranju je delovna skupina CARTOX (Neelapu 2017) razvila nova merila, ki jih je pozneje izpopolnil odbor ASTCT (Hines 2023), pri čemer IEC-HS opredeljuje visoka raven feritina ($> 2 \times$ normalna zgornja meja ali izhodiščna vrednost) in/ali hitro naraščajoča vrednost, citopenije, motnje koagulacije

s hipofibrinogenemijo in/ali zvišanje jetrnih encimov (tabela 1).

Kriteriji IEC-HS	Klinični/laboratorijski znaki
Najpogostejše manifestacije	<ul style="list-style-type: none"> ● Zahtevano: povišan feritin (> 2 x ZMN ali izhodiščna vrednost (v času infuzije)) in/ali hitro naraščajoča vrednost ● Začetek ob koncu CRS ali poslabšanje vnetnega odziva po začetnem izboljšanju z CRS usmerjeno terapijo ● Zvišanje vrednosti jetrnih transaminaz (>5 x ZMN (če je bila osnovna vrednost normalna) ali >5 x osnovne vrednosti, če osnovna vrednost ni bila normalna) ● Hipofibrinogenemija (<150 mg/dl ali < SMN) ● Hemofagocitoza v kostnem mozgu ali drugih tkivih ● Citopenije (novonastale, poslabšanje ali refraktarne)
Druge manifestacije, ki so lahko prisotne	<ul style="list-style-type: none"> ● Povišan LDH (> ZMN) ● Druge motnje hemostaze (npr. povišan PČ/PTČ) ● Direktna hiperbilirubinemija ● Novonastala splenomegalija ● Vročina (novo nastala ali vztrajajoča) ● Nevrotoksičnost ● Pljučne manifestacije (npr. hipoksija, pljučni infiltrati, pljučni edem) ● Ledvična insuficienca (novo nastala) ● Hipertrigliceridemija (raven na tešče > 265 mg/dL)

Tabela 1: IEC-HS kriteriji (ASTCT)

Zaradi zapletenosti in resnosti IEC-HS sta skrbno spremljanje in takojšnje, agresivno zdravljenje ključnega pomena za učinkovito obravnavo bolnikov. Začetno zdravljenje običajno vključuje anakinro s kortikosteroidi ali brez njih, odvisno od kliničnega stanja bolnika in resnosti vnetnega odziva. Specifični odmerek in kombinacijo je treba prilagoditi glede na resnost IEC-HS, pri čemer je v težjih primerih morda že od začetka treba uporabiti večje odmerke ali dvojno zdravljenje. Če se stanje poslabša, lahko zdravljenje druge izbire vključuje povečanje odmerka ali dodajanje novih zdravil, kot je zaviralec JAK1/2 ruxsoltinib.

sHLH po alogenski PKMC

Kljub ozaveščanju je sHLH še vedno premalo prepoznan smrtno nevaren zaplet po alogenski presaditvi matičnih celic z večjimi neizpolnjenimi potrebami po hitrejši diagnozi in zlasti kliničnem zdravljenju. Učinkovito zdravljenje zahteva agresivno imunosupresijo za obvladovanje prekomernega vnetja v kombinaciji s ciljnim zdravljenjem proti sprožilnim dejavnikom. Diagnostika je pri sHLH po alogenski PKMC pragmatična. Uveljavil se je točkovnik H score, ki napove verjetnost za sHLH. Vključuje znano imunosupresivno terapijo, vročino, organomegalijo,

citopenije, feritin, nivo trigliceridov, fibrinogen, AST in hemofagocitozo v kosnem mozgu. Presaditvi prilagojen točkovnik zaobjema še manj kriterijev - 2 major: slabo delovanje presadka, histološke znake hemofagocitoze in 4 minor kriterije: vročina, hepatosplenomegalija, povišan feritin, povišana LDH. Hitro prepoznavanje in zdravljenje pomembno zmanjšujeta umrljivost, zato je tu poudarjena pragmatičnost. Možna zdravila za zdravljenje sHLH po alogenski PKMC so anakinra, ruksolitinitib, etopozid, tocilizumab, rituksimab, Cytosorb, IVIG, ATG, alemtuzumab, metotreksat, vinkristin, baricitinib in siltuksimab. Različne patogene poti konvergirajo v skupno končno fazo fulminantnega HLH, ki je podobna kot pri primarni HLH. HLH lahko opišemo kot "pražno" bolezen. Moč različnih dejavnikov se kombinira, dokler ni presežen prag, nad katerim vnetje ni več nadzorovano. Tesen odnos sHLH z GvHD je pogosta tema in tako sHLH kot GVHD je lahko del "hipervnetnega" spektra. Izpostavljenost GvHD lahko povzroči pojav "trenirane imunosti", ki povzroča nagnjenost h prekomernemu vnetju v obliki sHLH, ko se sproži odziv, na primer zaradi EBV ali druge okužbe. Vse več je dokazov, da je ruksolitinitib učinkovit pri obvladovanju sHLH. V primerjavi s steroidi omogoča boljšo imunsko rekonstitucijo in tkivno toleranco. Pri sHLH se zdi, da ima vztrajno izplavljanje IFN- γ najbolj negativen učinek na hematopoezo. Zaviranje signalizacije IFN- γ z ruksolitinitibom lahko pri sHLH celo izboljša hematopoezo, vendar je čas uvedbe terapije ključnega pomena. V kolikor je stroma kostnega mozga uničena po prekomernem vnetju, tudi hemopoza ne bo boljša.

HLH povezan z malignostjo

HLH, ki je povezana z malignostjo (mal-HLH) je v izrazitem porastu incidence (na Švedskem se je letna incidenca povečala za 10x), vendar verjetno ne zaradi večje pojavnosti, temveč večje ozaveščenosti. V letih 1997 do 2011 je bila HLH usmerjena terapija že uporabljena pri večini bolnikov z diagnozo HLH; in približno polovica je prejela etopozid. Trenutno soglasje o terapiji za mal-HLH je, da se najprej uvede zdravljenje, usmerjeno v HLH, vključno s kortikosteroidi, imunoglobulini in etopozidom, in nato začne zdravljenje, usmerjeno proti malignemu obolenju. Pomembno je, da bolnikom z mal-HLH ne bi smeli dajati celotnega protokola HLH-94/HLH-2004, temveč krajši čas in nižjo intenzivnost; priporočljiv je odmerek etopozida od 50 do 100 mg/m² (odvisno od starosti) intravensko enkrat na teden. V zadnjih letih so opazili obetavno učinkovitost

uporabe tarčnih inhibitorjev vključno z interleukinom-1 (anakinra), interleukinom-6 (tocilizumab) in JAK1/2 (ruksolitinib). Številne študije vključujejo ruksolitinib v sheme z etopozidom in/ali deksametazonom z namenom znižanja doz slednjih. S takim pristopom lahko umilimo citokinsko neviho z minimalno mielosupresijo in pridobimo čas za ustrezno histološko diagnostiko limfoma, ki potem narekuje ustrezen usmerjen režim zdravljenja.

Literatura:

1. Hines MR et al. Transplantation and Cellular Therapy Immune Effector Cell-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis-Like Syndrome. *Transplant Cell Ther.* 2023
2. Fugere T et al. Immune Effector Cell-Associated HLH-like Syndrome : A Review of the Literature of an Increasingly Recognized Entity. 2023
3. Bellal M, Malherbe J, Damaj G, Cheyron D Du. Toxicities , intensive care management , and outcome of chimeric antigen receptor T cells in adults : an update. *Crit Care.* 2024.
4. Meeths M, Bryceson YT. Genetics and pathophysiology of haemophagocytic lymphohistiocytosis. 2021.
5. Löfstedt A, Jädersten M, Meeths M, Henter JI; Malignancy-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Sweden: incidence, clinical characteristics, and survival. *Blood* 2024.
6. Lee, J.C.; Logan, A.C. Diagnosis and Management of Adult Malignancy-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Cancers* 2023.

Uporaba zdravil za uravnavanja hemostatskega ravnovesja pri bolnikih s hemofilijo

Preložnik Zupan Irena, Rener Karla

KO za hematologijo, UKC Ljubljana

Irena.zupan@kclj.si

UVOD

V zadnjih tridesetih letih je zdravljenje hemofilije močno napredovalo, izboljšala se je kvaliteta življenja bolnikov, življenjska doba pa se je praktično izenačila z zdravo populacijo.

Današnji standard zdravljenja hemofilije v razvitem svetu je redna profilaksa vseh bolnikov s težko in večine bolnikov s srednje težko obliko bolezni z uporabo koncentratov manjkajočega koagulacijskega faktorja. Ta pristop zadostno nadzoruje pojav krvavitev v sklepe in zavira nastanek artropatije. Kljub napredku pa je redna, ponavljajoča intravenska infuzija 1x, 2x ali 3x tedensko, obremenjujoča za bolnike. Tudi razvoj inhibitorjev je na podlagi trenutnih oblik zdravljenja še vedno visok. Učinkovitejši in manj obremenjujoči načini zdravljenja bi zagotovili pomembne koristi za te bolnike.

OBVLADOVANJE NAGNjenosti h KRVAVITVAM V SODOBNEM ČASU

Obstajata dve glavni strategiji obvladovanja nagnjenosti h krvavitvam pri hemofiliji, pri vsaki od njiju pa je v razvoju več možnih pristopov (Slika 1):

1 - povečanje aktivnosti manjkajočega faktorja:

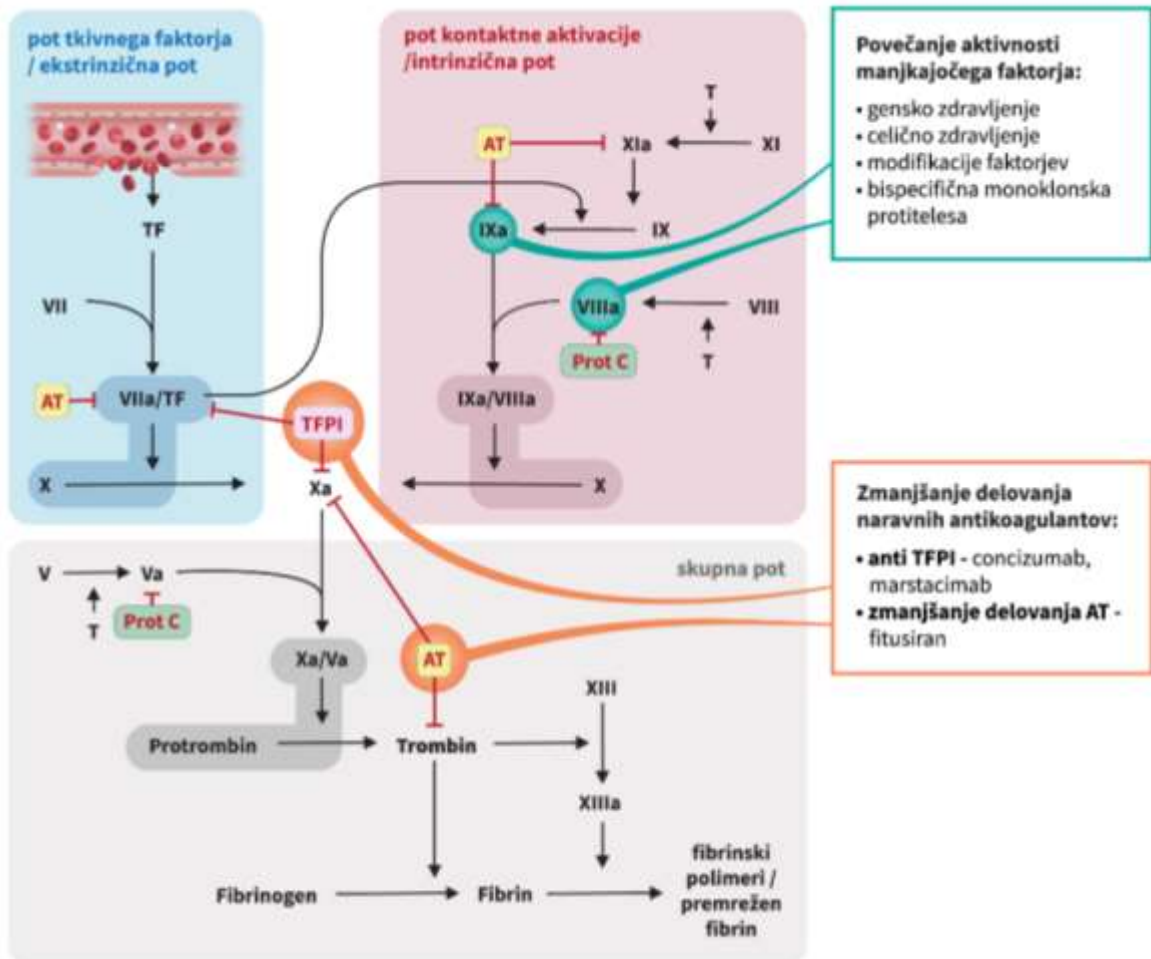
- gensko zdravljenje, ki nadomešča manjkajoči faktor koagulacije,
- celično zdravljenje, ki lahko proizvaja manjkajoči faktor,
- modifikacije faktorjev, kot sta podaljšanje razpolovnega časa ali podkožno dajanje,

-nadomestki faktorja, kot so bispecifična monoklonska protitelesa.

2 - zmanjšanje delovanja naravnih inhibitorjev koagulacije:

- majhne molekule, ki zmanjšajo raven tarčnih antikoagulantov,

- monoklonska protitelesa ali majhne molekule, ki blokirajo delovanje.



Slika 1. Shema sodobnega, celičnega, modela koagulacijske kaskade in inhibitorji koagulacije, antitrombin (AT), protein C (prot C) in inhibitor poti tkivne ga faktorja (TFPI) na mestu delovanja v koagulacijski kaskadi. V zelenem in oranžnem okviru so navedeni novi pristopi k zdravljenju hemofilije in njihovo mesto delovanja. TF – tkivni faktor. Sliko je izrisala Dora Rupčič.

POVEČANJE AKTIVNOSTI MANJKAJOČEGA FAKTORJA

Gensko zdravljenje hemofilije

Hemofilija je na nek način idealna bolezen za gensko zdravljenje. Običajno gre za mutacijo enega gena, ki pripelje do pomanjkanja ali motene funkcije produkta tega gena, to je koagulacijski faktor in že minimalen porast aktivnosti manjkajočega faktorja strjevanja (npr. $\geq 5\%$) pomembno izboljša klinično sliko, pri čemer iz težke oblike bolezni naredimo lahko. Genska terapija vnese eksogeno DNA v celice, ki se lahko uporabijo za proizvodnjo pomanjkljive beljakovine. Pri enogenih boleznih, kot je hemofilija, lahko to vključuje gen faktorja divjega tipa ali modificiran gen z izboljšanimi lastnostmi, kot je večja aktivnost ali daljša razpolovna doba.

Celično zdravljenje

Pri celičnem zdravljenju se v bolnika vnesejo intaktne celice, avtologne ali tuje celice. Izven telesa jih ustrezno pripravijo s podobnimi metodologijami kot za gensko zdravljenje, vsebujejo gen za manjkajočo beljakovino. Tuje celice potrebujejo še imunsko obdelavo, da ne pride do zavrnitve in jih nato ponovno uvedejo v telo. Zaenkrat gre za predklinične raziskave.

Faktorji s podaljšanim razpolovnim časom

Razpolovni čas FVIII v plazmi je 10 do 12 ur, FIX pa 16 do 18 ur. Na voljo je več modifikacij faktorjev za podaljšanje razpolovnega časa, rekombinantna fuzija z imunoglobulinskim območjem Fc ali albuminom ter PEGilacija (kovalentno vezanje polietilen glikola - PEG na določenih točkah molekule F). Glavna prednost je podaljšan interval med odmerki, kar zmanjšuje obremenitve

bolnika, povezane z intravenskim dostopom. Izboljšale so zlasti razpolovno dobo FIX, manj FVIII. Sedaj prihaja na svetovno tržišče tudi ta različica rFVIII, vezanega na del vWF, ki pomembno podaljša razpolovni čas FVIII.

Nadomestki za koagulacijske faktorje oz. nefaktorsko zdravljenje, ki pospeši koagulacijsko pot

Bispecifična humanizirana monoklonska protitelesa - emicizumab je bispecifično humanizirano monoklonsko protitelo, ki se uporablja za profilakso pri hemofiliji A. Mim8 je še eno, novejše bispecifično monoklonsko protitelo v razvoju, ki prav tako nadomešča vlogo faktorja VIIIa pri združevanju faktorja XIa in faktorja X. Podobno kot emicizumab se lahko daje podkožno pri osebah s hemofilijo A, tako z inhibitorji kot brez njih.

URAVNAVANJE RAVNOTEŽJA HEMOSTAZE PREKO SISTEMA NARAVNIH INHIBITORJEV KOAGULACIJE

Običajno je hemostatski sistem uravnotežen med prokoagulantni, kot so koagulacijski faktorji, in njihovimi zaviralci, kot je antitrombin (AT), pot proteina C/proteina S in zaviralec poti tkivnega faktorja (TFPI). To ravnovesje zagotavlja, da se v normalnem življenju izognemo čezmernim krvavitvam in trombozam. Pomanjkanje ali zmanjšane količine prokoagulantnih faktorjev povzročijo krvavitve, zmanjšane količine zaviralcev strjevanja krvi pa povzročijo tromboze. Pri nekaterih bolnikih s hemofilijo, ki imajo prirojeno trombofilijo, so opazili manj pogoste ali blažje krvavitve. To je privedlo do razvoja pristopov zdravljenja, ki ciljajo na endogene antikoagulacijske beljakovine, zmanjšanje njihove aktivnosti, s čimer se ponovno vzpostavi ravnovesje med prokoagulantnimi in antikoagulantnimi dejavniki v koagulacijski kaskadi. AT, TFPI, prot C in prot S so bili cilj tega terapevtskega pristopa. Ker povečujejo nastajanje trombina na splošno in ne s popravljanjem pomanjkanja določenega dejavnika, lahko ti pristopi k zdravljenju zmanjšajo krvavitve ne glede na pomanjkanje koagulacijskega faktorja.

Zmanjšanje delovanja AT –AT je naravni antikoagulant, ki zavira trombin (faktor IIa), faktor Xa in druge serinske proteaze v koagulacijski kaskadi, kot je faktor IXa, XIa in FVIIa. Zmanjšana aktivnost AT lahko povzroči protrombotično stanje. V primeru pomanjkanja koagulacijske beljakovine, npr.: hemofilija A/B, z zmanjšanjem aktivnosti AT uravnesimo stanje v hemostazi in zmanjšamo nagnjenost h krvavitvam. RNA-interferenca je biološki postopek, pri katerem se z molekulami RNA nevtralizirajo ciljne molekule sporočilne RNA (mRNA) in s tem zavira izražanje genov (gensko prevajanje – translacija). Fitusiran je mala interferenčna molekula RNA (siRNA), ki pred translacijo razgradi mRNA, ki kodira AT. siRNA so komplementarne zaporedjem določene celične mRNA, zato povzročijo razgradnjo ciljne mRNA in tako utišajo ekspresijo gena. Fitusiran se lahko daje pod kožo in je učinkovit pri HA in HB. Predhodna farmakokinetična analiza je pokazala, da ima zdravilo kratko razpolovno dobo v plazmi (tri do pet ur), zmanjšanje ravni AT pa traja več tednov. Študije z zdravilom še potekajo.

Anti-TFPI - TFPI je naravni zaviralec koagulacije, majhna polipeptidna molekula, ki se nahaja na endotelijskih celicah, pa tudi v plazmi, trombocitih in monocitih. Reverzibilno inhibira FXa in ekstrinzični tenazni kompleks TF–FVIIa. Concizumab je monoklonsko protitelo proti TFPI, ki se lahko daje podkožno (kot v kliničnih preskušanjih) ali intravensko. Učinkovit je pri HA in HB. Zaradi pojava trombotičnih dogodkov je bilo sprva klinično preizkušanje ustavljeno, kasneje pa ponovno uvedeno. Marstacimab je še ena različica anti-TFPI, ki se preizkuša.

ZAKLJUČEK

Ne-faktorsko zdravljenje hemofilije omogoča lažjo uporabo in enakovredno ali celo boljše profilaktično zdravljenje hemofilije, tako z inhibitorji ali brez njih. Trenutno je za klinično uporabo odobren le emicizumab, čakamo mim8, medtem ko so zdravila za uravnavanje hemostatskega ravnovesja še v zadnjih kliničnih raziskavah. Kljub temu se zdi verjetno, da ta vrsta nefaktorskih učinkovin ponuja možnost ne le za zmanjšanje krvavitev, temveč tudi za izboljšanje fizičnega in duševnega bremena, povezanega z zdravljenjem. Upamo, da bodo tudi cenovno dostopna.

Literatura

1. Nogami K, Shima M. Current and future therapies for haemophilia - Beyond factor replacement therapies. *Br J Haematol.* 2023 Jan;200(1):23-34.
2. Franchini M, Mannucci PM. The More Recent History of Hemophilia Treatment. *Semin Thromb Hemost.* 2022 Nov;48(8):904-10.
3. Preložnik Zupan I, Anžej Doma S, Faganel Kotnik B, Renner K, Fink M, Podgornik H, et al. Hemostaza skozi klinične primere. 1. izd. Ljubljana: Združenje hematologov Slovenije, 2022
4. Mancuso EM, Croteau SE, Klamroth R. Benefits and risks of non-factor therapies: Redefining haemophilia treatment goals in the era of new technologies. *Haemophilia.* 2024;1–6.

CAR-T zdravljenje (ZHS, HLZ, SMSZT)

Indikacije za zdravljenje z akademskimi CAR-T celicami v UKC Ljubljana

Sever M, Zver S

KO za hematologijo, UKC Ljubljana

Povzetek

Na KO za hematologijo, UKC Ljubljana uporabljamo CAR-T celično zdravljenje, tisagenlecleucel, od leta 2020. Od leta 2023 smo poslali v tujino posamične bolnike na zdravljenje z edinim drugim CAR-T produktom, ide-celom. Tisa-cel je edini komercialni pripravek, ki je na voljo pri nas, in zaenkrat ne kaže, da bi druga podjetja s svojimi produkti na voljo v evropskih državah kazala pripravljenost za prihod v Slovenijo (Tabela 1). Razlog so težave s proizvodnjo vektorjev in samih CAR-T celic. Iz tega razloga smo se odločili za razvoj lastnega akademskega CAR-T celičnega produkta v sodelovanju s podjetjem Miltenyi, ki zagotavlja vektor z genetskim zapisom za receptor CD19 in napravo za proizvodnjo CAR-T celic, pod pogojem, da izvajamo zdravljenje bolnikov v klinični raziskavi. Začetek sodelovanja z Miltenyi sega v obdobje, ko je bila CAR-T celična terapija indicirana pri otrocih za ALL, pri odraslih pa za DVCBL kot tretji red. Pogoj za sodelovanje je bila zaveza, da se akademski produkt ne uporabi v navzkrižju z indikacijo komercialnega produkta. Zato smo takrat izbrali za prvo indikacijo našega CAR-T produkta ALL pri odraslih v tretji liniji. V zadnjih letih se je indikacija komercialnih CAR-T razširila in jih uporabljamo tudi v drugi liniji, tako da načrtujemo takoj po oddaji protokola za ALL pri odraslih pričeti pripravljati protokol za DVCBL v drugi liniji. S kolegi v Španiji se dogovarjamo za sodelovanje v raziskavi ali pa nakup vektorja za CAR-T proti BCMA pri diseminiranem plazmocitomu. V končni fazi, čez nekaj let, pričakujemo, da bomo imeli lastno proizvodnjo CAR in vektorja v sodelovanju s Kemijskim inštitutom.

Generično ime	Indikacija	Red terapije	Zaščiteno ime	Podjetje	Približni stroški
Tisagenlecleucel	Akutna limfoblastna levkemija (ALL)	2. red	Kymriah	Novartis	\$475,000
	Difuzni velikocelični B-celični limfom (DVCBL)	3. red			
Axicabtagene Ciloleucel	Difuzni velikocelični B-celični limfom (DVCBL)	2. red	Yescarta	Gilead Sciences	\$373,000
	Visoko tvegani R/R DVCBL	3. red			
Brexucabtagene Autoleucel	Limfom plasičnih celic (LPC)	2. red	Tecartus	Kite Pharma	621,933
	Akutna limfoblastna levkemija (ALL) pri odraslih	3. red			
Lisocabtagene Maraleucel	Difuzni velikocelični B-celični limfom (DVCBL)	2. red	Breyanzi	Bristol Myers Squibb	\$447,227
	Visoko tvegani R/R DVCBL	3. red			
Idecabtagene Vicleucel	Ponavljajoči in odporni multipelni mielom	4. red	Abecma	Bristol Myers Squibb	\$419,500
Ciltacabtagene Autoleucel	Ponavljajoči in odporni multipelni mielom	4. red	Carvykti	Janssen	\$465,000

Tabela 1: Primerjava komercialnih CAR-T celičnih terapij v Evropski uniji (priprava tabele s pomočjo Microsoft Copilot, zajem podatkov marec 2024).

Laboratorijsko spremljanje in pomen po infuziji CAR-T celic

Katarina Reberšek

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

katarina.rebersek@kclj.si

Uvod

Zdravljenje s CAR («chimeric antigen receptor») T celicami velja za pomemben korak v imunoterapiji krvnih rakavih bolezni. Pri zdravljenju je citotoksični potencial limfocitov T usmerjen proti malignim celicam. CART celice, usmerjene proti CD19, imajo trenutno uveljavljeno vlogo pri zdravljenju BALL in difuznega velikoceličnega B limfoma (DVCBL). Uspeh terapije je navdihnil raziskovalce, da razširijo indikacije na področje solidnih tumorjev, avtoimunskih in infekcijskih bolezni.

Osnovna struktura CART celic obsega tri glavne komponente: (1) zunajcelično, antigen specifično domeno predstavlja ena veriga variabilnega dela protitelesa (scFv-»single chain variable fragment«); (2) transmembransko domeno; in (3) znotrajcelično domeno, ki posreduje signalizacijo. Prva generacija CART celic ima samo znotrajcelično domeno CD3, druga generacija ima dodano kostimulatorno domeno (CD28 ali 4-1BB), tretja generacija pa ima dodani 2 kostimulatorni domeni.

Laboratorijsko spremljanje CART celic

Ker so CART celice živa terapija, je prisotna velika razlika v kinetiki med različnimi CART celicami ter tudi znotraj CART celic, ki so usmerjene proti istemu antigenu in del istega proizvodnega procesa. EBMT (European Society for Blood and Marrow Transplantation) in JACIE (Joint Accreditation Committee of ISCT-Europe and EBMT) pri zdravljenju priporočata srednje in dolgoročno laboratorijsko spremljanje CART celic.

CART celice lahko spremljamo s pomočjo neposrednih in posrednih metod.

Neposredne metode

Med neposrednimi metodami sta najbolj v uporabi pretočna citometrija in molekularno genetske metode. Molekularno genetske metode, med katerimi sta najbolj v uporabi kvantitativni in digitalni PCR, zaznajo prisotnost vstavljenega genskega materiala s specifičnimi CAR oligonukleotidnimi začetniki.

Pretočna citometrija zazna in kvantificira CART celice tako, da prepozna CAR na površini celice. Pri zaznavi CART celic se lahko uporabi reagente, ki so antigen specifični ali univerzalne reagente. Antigen specifični reagenti se vežejo na vezavno mesto za antigen na scFv. Njihova prednost je, da imajo nizko ozadje, vendar so dragi in jih je mogoče uporabiti le za določen scFv. Univerzalna reagenta protein L in F(ab')₂ fragment se vežeta na lahko verigo oziroma na Fab del imunoglobulina. Univerzalne reagente lahko uporabimo za različne scFv, niso dragi, vendar povzročajo nespecifično barvanje. Pretočna citometrija lahko tudi opredeli posamezne subpopulacije v smislu diferenciacije, aktivacije, izčrpanosti in senescence.

Posredne metode

Posredno lahko CART celice spremljamo preko absolutnega števila limfocitov. Zaradi limfodeplecije absolutno število običajno doseže najnižjo vrednost okoli časa infuzije CART celic, nato sledi porast in vrhunec v naslednjih 15-ih dneh. Na prisotnost CART celic lahko sklepamo tudi z merjenjem deleža celic, ki izražajo tarčni antigen, ali njihovih produktov. V primeru CART celic, usmerjenih proti CD19, lahko spremljamo delež oziroma aplazijo limfocitov B (BCA).

Pomen spremljanja CART celic z direktnimi metodami

Dejavnika, ki vplivata na izid in trajnost odziva po infuziji CART celic, sta proliferacija (ekspanzija) in stalna prisotnost. Pri bolnikih z BALL, ki so odgovorili na zdravljenje, so opazili višje vrednosti

CART v primerjavi s tistimi, ki na zdravljenje niso odgovorili. Obenem so vrednosti korelirale z vrednostmi citokinov, ki pa so po drugi strani povezani z neželenimi učinki, ko sta CRS («cytokine release syndrome») in ICANS («immune effector cell-associated neurotoxic syndrome»).

Pri DVCBL je najvišja koncentracija CART celic podobna med tistimi, ki so se odzvali na zdravljenje in tistimi, ki se niso, vendar je skoraj šestkrat nižja kot pri BALL. Kljub temu pa so pomembne razlike v zaznavi oziroma stalni prisotnosti, in sicer so pri tistih, ki so se odzvali na zdravljenje, CART celice zaznali 280 dni, pri tistih, ki se niso odzvali na zdravljenje pa 28 dni.

Po fazi ekspanzije in hitrega upada CART celice vstopijo v fazo postopnega upada. Čeprav ta končna faza poteka pri nekaterih posameznih bolnikih na izjemno visokih ravneh, večina bolnikov vzdržuje zelo nizke deleže, včasih celo pod mejo zaznave. Čeprav stalna prisotnost BCA pri večini bolnikov kaže, da lahko takšne nizke koncentracije zadostujejo za učinkovito delovanje CART celic, je mogoče, da padec pod posamezno raven prispeva k zmanjšani aktivnosti CART celic. Zato je funkcionalnost CART celic treba razlikovati od analitične zaznave (LOD). Ponovitev bolezni je pogosta, ko je izguba BCA po zdravljenju s CART celicami povezana s padcem cirkulirajočih CART celic.

Pomen spremljanja CART celic s posrednimi metodami

Pri BALL, kjer so limfociti B predstavljali >1% med levkociti ali >3% med limfociti v prvih 6 mesecih po zdravljenju, je prišlo do hitrejše izgube CART, kar je bilo povezano s preživetjem brez dogodka. Pri DVCBL je kvantifikacija limfocitov B v periferni krvi manj uporabna kot pri BALL, ker je večina bolnikov z DVCBL zdravljena z monoklonskimi protitelesi, ki so usmerjena proti CD20, ki pa vplivajo na število limfocitov B. In čeprav obstaja povezava naraščanja deleža limfocitov B ob zmanjševanju deleža CART, ta ni tako močna kot pri bolnikih z BALL. Zaznan je bil namreč sočasen pojav limfocitov B in CART celic ter ponoven pojav BCA sočasno z naraščanjem deleža CART.

Kljub temu, da zaznava CART celic in BCA predstavljata ugodno prognozo, ne izključujeta pojava CD19 negativnega (ekstramedularnega) relapsa.

Spremljanje bolezni

Štiri tedne po infuziji CART celic se pri bolnikih z BALL izvede punkcija in biopsija kostnega mozga ter določi MRD, pri čemer se MRD negativnost pogosto doseže zgodaj (znotraj 1 meseca). Nadaljnje spremljanje kostnega mozga poteka na tri mesece znotraj enega leta. V primeru DVCBL ocena odziva temelji predvsem na slikovnih preiskavah.

Heterogenost odziva in heterogenost subpopulacij CART celic

Med subpopulacijami CART celic je pri večini bolnikov obrnjeno razmerje med CD4 in CD8, vendar pri nekaterih bolnikih CART celice predstavljajo skoraj izključno CD4. Primerjava subpopulacij je pokazala, da večino predstavljajo efektorske spominske celice in centralne spominske celice. Naivne CART celice so bile zaznane v nižjih deležih, kar je skladno z diferenciranjem limfocitov T po obsežni izpostavitvi tarčnemu antigenu in proliferacijo. Med fazo stalne prisotnosti so bili opaženi višji deleži naivnih CART celic. Ena možna razlaga bi lahko bila, da medtem ko spominske in efektorske celice postopoma umirajo, se lahko delež naivnih T celic poveča in igra vlogo pri vzdrževanju dolgoživeče zaloge CART celic. Dodatno so ugotovili, da je povečan delež celic CARTreg (CD4+CD57–Helios+ FOXP3+CD25+) 7.dan po infuziji CART povezan s progresom bolezni in zmanjšano nevrotoksičnostjo. To so celice, ki skladno s klasičnimi Treg celicami nimajo citotoksičnega potenciala. Njihova zaviralna funkcija lahko zmanjša protitumorski odziv, toksičnost in ekspanzijo.

Kljub zgodnjim uspehom zdravljenja s CAR T celicami ostajajo številni izzivi pri razvoju, in sicer doseganje dolgotrajne in popolne remisije pri vseh bolnikih, pri čemer so stranski učinki sprejemljivi. Pomoč pri reševanju teh izzivov pomaga tudi razumevanje biologije CART celic, ki jo lahko predstavimo tudi z imunofenotipizacijo CART celic ob rutinskem spremljanju bolnikov.

Literatura

1. Demaret J, Varlet P, Trauet J, Beauvais D, Grossemy A, Hégo F, et al. Monitoring CAR T-cells using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2021;100(2):218-24.
2. Good Z, Spiegel JY, Sahaf B, Malipatlolla MB, Ehlinger ZJ, Kurra S, et al. Post-infusion CAR T_{Reg} cells identify patients resistant to CD19-CAR therapy. *Nat Med.* 2022;28:1860–71.
3. Sarikonda G, Mathieu M, Natalia M, Pahuja A, Xue Q, Pierog PL, et al. Best practices for the development, analytical validation and clinical implementation of flow cytometric methods for chimeric antigen receptor T cell analyses. *Cytometry B Clin Cytom.* 2021;100(1):79-91.
4. Selim AG, Minson A, Blombery P, Dickinson M, Harrison SJ, Anderson MA. CAR-T cell therapy: practical guide to routine laboratory monitoring. *Pathology.* 2021;53(3):408-15.

Ravnanje z gensko spremenjenimi organizmi v bolnišničnem okolju

Veronika Mikolič, Irena Auersperger

Klinični oddelek za hematologijo, UKC Ljubljana

veronika.mikolic@kclj.si, irena.auersperger@kclj.si

V zadnjem desetletju je opazen izjemen razvoj na področju naprednih celičnih in genskih terapij, kar priča tudi strmo naraščanje števila kliničnih študij na tem področju. Mnogo izmed teh inovativnih terapij temelji na namerni spremembi genoma, kar jih uvršča med gensko spremenjene organizme (GSO). GSO so po definiciji organizmi, z izjemo človeka, katerega genski material je spremenjen s postopki, ki spreminjajo genski material drugače kot to poteka v naravnih razmerah s križanjem ali naravno rekombinacijo. V skladu z zakonodajo Evropske unije (EU) o GSO je potrebno slediti predpisom in postopkom za zagotavljanje varnosti pred njihovo uporabo v medicinske namene. Pri tem je pomembno omeniti, da se okvir za GSO razlikuje med zdravili, ki so že odobrena za promet, ter uporabo GSO v kliničnih preskušanjih. Za zdravila na trgu, se v skladu z Direktivo EU, GSO vidik obravnava pri vlogi za dovoljenje za promet. Odobritev kliničnih preskušanj z zdravili, ki vključujejo ali so sestavljena iz GSO pa spada v pristojnost posameznih držav članic EU in se lahko razlikuje glede na nacionalne določbe. V Sloveniji ravnanje z GSO in ukrepe za preprečevanje in zmanjševanje možnih škodljivih vplivov na okolje in na zdravje ljudi ureja Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (ZRGSO).

Eden od obetavnih pristopov celičnega zdravljenja je terapija z gensko spremenjenimi limfociti T, ki na svoji površini izražajo himerne antigenske receptorje (CAR T). Celična terapija CAR T se je izkazala kot učinkovit pristop pri zdravljenju določenih hematoloških malignih obolenj. Pri pripravi celic se za vnos genskega zapisa za sintetični protein CAR v bolnikove celice najpogosteje uporabljajo lentivirusni vektorji. Priprava lentivirusnih vektorjev za klinično uporabo je postopek, ki se izvaja pod pogoji dobre proizvodne prakse v obratih, ki izpolnjujejo ukrepe za zagotavljanje biološke varnosti. Glede na različna varnostna tveganja ločimo več generacij lentivirusnih vektorjev. Trenutno v klinični praksi prevladujejo lentivirusni vektorji tretje ali četrte generacije.

Ti vektorji so varnejši, saj so posamezni virusni elementi ločeni na več različnih plazmidov. Prav tako je odstranjen večji del virusnega genoma, tako da virus nima sposobnosti replikacije, medtem ko so ohranjeni ključni mehanizmi za učinkovito dostavo genov v ciljne celice.

Pri delu s celicami, ki so spremenjene z lentivirusnimi vektorji, bi v splošnem potencialno nevarnost lahko predstavljal virus, ki je sposoben razmnoževanja ali prisotnost ostankov infektivnih virusnih delcev v končnem izdelku. Kljub uporabi replikativno inkompetentnih virusov, odsotnost slednjih v sklopu kontrole kakovosti preveri tako proizvajalec lentivirusnega vektorja, kot tudi laboratorij, ki pripravlja celični pripravek. Celice CAR T v procesu spremembe dobijo samo zapis za receptor in ne pridobijo drugih zapisov za gene, ki bi jim dajale selekcijsko prednost. Dodatno varnostno zagotovilo predstavlja dejstvo, da limfociti T, ki so bili transducirani z lentivirusnimi vektorji, niso sposobni preživetja zunaj zaprtega in zelo natančno nadzorovanega okolja.

V bolnišničnem okolju se lahko srečujemo s CAR T produkti, ki so odobreni s strani Evropske agencije za zdravila in imajo dovoljenje za promet. Ker imamo v Sloveniji, na Kliničnem oddelku za hematologijo (KOH), UKC Ljubljana trenutno na razpolago samo en CAR T komercialni produkt, smo si v sodelovanju z Inštitutom za mikrobiologijo, Medicinske fakultete Ljubljana zastavili projekt lastne proizvodnje celičnih pripravkov CAR T. Proces bo potekal v sklopu kliničnega preskušanja, sprva za odrasle bolnike z levkemijo ALL, ki so izvzeti iz komercialnega CAR T celičnega zdravljenja, sčasoma pa tudi za druge hematološke bolnike. Za klinično preskušanje zdravil, ki vsebujejo ali so sestavljena iz GSO, je potrebno k vlogi za pridobitev dovoljenja, priložiti tudi ustrezna dovoljenja, kot je opredeljeno v ZRGSO. Delo z GSO in zaprt sistem, v katerem bo delo potekalo, sta že vpisana v Register GSO. V postopku pridobivanja dovoljenja so poleg navodil za delo z GSO, ustreznih prilog in ocene tveganja, vključeni še načrt ukrepov v primeru izrednega dogodka ali nesreče ter načrt zadrževalnih ukrepov. Celični pripravek CAR T, ki je predmet našega kliničnega preskušanja, uvrščamo v 2. varnostni razred GSO, saj se za transdukcijo bolnikovih limfocitov uporablja lentivirusni vektor, ki spada v 2. varnostni razred. Pri delu z GSO v bolnišničnem okolju je zato potrebno upoštevati dodatne zadrževalne ukrepe, ki jih določa zakonodaja. Pri aplikaciji celičnega pripravka ob standardnih operativnih postopkih zdravljenja

CAR T in že obstoječih varnostnih ukrepih, sledimo tudi navodilom za delo z GSO. Spodaj so povzeti določeni zadrževalni ukrepi. Vstop v bolniško sobo, ki je registrirana kot zaprt sistem za delo z GSO, je omejen in med delom z GSO omogočen le pooblaščenim osebam. Vhod v bolniško sobo je med delom z GSO označen z znakom za biološko nevarnost, kot ga določajo predpisi, ki urejajo varovanje delavcev pred tveganjem zaradi izpostavljenosti biološkim dejavnikom pri delu. Vrata so med delom z GSO zaprta, okna so zatesnjena in zaklenjena, da se jih ne da odpreti. Zdravstveni delavci morajo pri rokovanju s celičnim produktom upoštevati ustrezne previdnostne ukrepe in ob standardni zaščitni uniformi uporabljati še varnostno opremo (dvojne rokavice, maska, zaščitni plašč in zaščitna očala, ki tesnijo) za preprečevanje možnosti prenosa infekcijskih bolezni in za zaščito delavca pred neposrednim stikom z GSO. Infuzija CAR T celic poteka po navodilih in pod nadzorom zdravnika, ki ima izkušnje in je usposobljen za apliciranje CAR T terapije. Pred aplikacijo se preveri bolnikova identiteta in podatki na infuzijski vrečki celičnega pripravka. S težnostnim pretokom se aplicira celotna vsebina infuzijske vrečke. Vsako aplikacijo celičnega pripravka CAR T je potrebno zabeležiti v GSO obratovalni dnevnik. Uvedeni so bili dodatni ukrepi za odpadke, ki nastanejo pri delu z GSO in so bili v direktnem stiku s CAR T celicami (infuzijska vrečka z intravenskim sistemom za infundiranje, rokavice ali drugi material). Pred odstranitvijo v ustrezen odpadni zbirnik je potrebna inaktivacija teh odpadkov. Po koncu dela se inaktivirane odpadke hermetično zapre v plastični zabojnik iz trde plastike z možnostjo enkratnega zapiranja, ki je označen z znakom za biološko nevarnost. V nadaljevanju se postopa skladno z Načrtom za gospodarjenje z odpadki UKCL. V primeru manjšega razlitja celičnega pripravka je potrebno nemudoma preveriti obseg dogodka, omejiti prehod in kraj zavarovati pred nadaljnjim širjenjem GSO. Oseba, ki je prva prisotna na kraju nesreče uporablja ustrezno varovalno opremo. Manjše razlitje se takoj prekrije s papirnatimi brisačkami in prelije z razkužilom za površine ter pusti delovati ustrezen kontaktni čas. Med inaktivacijo se ne dotika čistih površin in zamenja rokavice. Oseba pokliče strežnico, ki čisti na oddelku in je usposobljena za ravnanje z odpadki GSO, da po predpisanem času odstrani umazane brisačke in onesnaženo površino očisti. Zdravstveni delavci morajo poznati navodila za preprečevanje incidentov in ukrepe. Ob nesreči, pri kateri bi prišlo do nenamerne sproščanja GSO iz zaprtega sistema 2. varnostnega razreda, se takoj obvesti

pooblaščenca za biološko varnost ter vse pristojne službe, da se zmanjša tveganje za zaposlene in druge osebe, ki sodelujejo pri odpravi ogroženosti in posledic nesreče.

Pred začetkom dela z GSO, morajo biti vsi zaposleni, ki bodo delali z GSO, ustrezno usposobljeni in seznanjeni s postopki in tveganji in o zadrževalnih ter drugih varnostnih ukrepih.

Literatura:

1. Milone, M.C., O'Doherty, U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* 32, 1529–1541; 2018.
2. Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (Uradni list RS, št. 23/05 – uradno prečiščeno besedilo, 21/10 in 90/12 – ZdZPVHVVR)
3. Direktiva 2009/41/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 6. maja 2009 o uporabi gensko spremenjenih mikroorganizmov v zaprtih sistemih
4. Direktiva 2001/18/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 12. marca 2001 o namernem sproščanju gensko spremenjenih organizmov v okolje

Diseminirani plazmocitom (ZHS)

Prvo zdravljenje diseminiranega plazmocitoma v letu 2024

Barbara Skopec, Matija Rozman

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

barbara.skopec@kclj.si

Bolnikov z diseminiranim plazmocitomom (DP) s konvencionalno terapijo ne pozdravimo. Zdravljenje lajša simptome, odpravi citopenije in zmanjša okvare končnih organov. Cilji zdravljenja so doseči in vzdrževati odziv na zdravljenje, izboljšati kvaliteto življenja in podaljšati celokupno preživetje (OS).

Z razvojem novih zdravil se je OS bolnikov z DP pomembno podaljšalo. Z večjim naborom zdravil se je povečalo število kombinacij zdravil, ki preko različnih mehanizmov delovanja učinkujejo proti DP. Zaradi narave bolezni in klonalne evolucije ter posledičnega razvoja na zdravljenje vse bolj odporne bolezni, želimo že v začetku uporabiti najbolj učinkovite kombinacije, s katerimi bi odstranili večino klonov in dosegli čim daljše obdobje brez ponovitve bolezni (PFS) in OS. Trenutno najučinkovitejša je kombinacija imunomodulatornega zdravila (IMiD), inhibitorja proteasomov (PI) in monoklonalnega anti-CD38 protitelesa, ob dodatku kortikosteroida.

Pristop k zdravljenju je odvisen od več dejavnikov, od katerih so najpomembnejši primernost za zdravljenje z avtologno presaditvijo krvotvornih matičnih celic (aPKMC), ocena tveganja glede na citogenetske spremembe in R-ISS status ob ugotovitvi bolezni.

Začetno zdravljenje bolnikov, ki so primerni za avtoPKMC

Za sposobne bolnike, stare do 70 let, brez spremljajočih bolezni, je indukcija, ki ji sledi aPKMC priporočeno zdravljenje zaradi dokazano daljšega PFS. Bolnik običajno prejme 3-4 kroge začetnega zdravljenja in nato nadaljuje z mobilizacijo in zbiranjem krvotvornih matičnih celic (KMC) in aPKMC. V začetnem zdravljenju uporabljamo kombinacije treh ali štirih zdravil.

Največkrat v začetnem zdravljenju uporabljamo kombinacijo VRd- bortezomib (podkožno, 1x tedensko; 1., 8. in 15. dan), lenalidomid (14 zaporednih dni, nato tedenski premor) in deksametazon (40 mg enkrat tedensko, 1., 8., 15. dan). Kroge zdravljenja ponavljamo na 3 tedne. Pred zbiranjem KMC prekinemo zdravljenje z lenalidomidom za vsaj 3 tedne, saj lahko bolnik zaradi tovrstnega zdravljenja slabše mobilizira KMC samo z za granulocitne kolonije stimulirajočim rastnim dejavnikom in moramo nato za uspešno mobilizacijo uporabiti dodatno še pleriksafor ali ciklofosamid.

Če ima bolnik ob odkritju bolezni akutno ledvično odpoved, namesto lenalidomida v trojčku uporabimo talidomid ali ciklofosamid. Kombinacija VTd ima v primerjavi z VCd nekoliko boljše rezultate pri odzivu na zdravljenje (za vpliv na dolgoročno preživetje pa ni podatka), je pa pri kombinaciji VCd precej manjše tveganje za pojav periferne polinevropatije (PNP), ki jo lahko povzročita tako talidomid kot bortezomib. Pojavnost PNP po zdravljenju z bortezomibom se je močno zmanjšala, ko smo začeli zdravilo odmerjati enkrat tedensko (namesto dvakrat tedensko; sicer se lahko uporabi ob želji po hitrem nadzoru ob agresivni bolezni ali pri ledvični odpovedi) in podkožno namesto intravensko. Če se vseeno pojavi, prvo zmanjšamo odmerek bortezomiba, v kolikor pa se kljub temu slabša, zdravilo ukinemo.

Pri bolnikih z DP z velikim tveganjem v začetno zdravljenje dodamo monoklonsko protitelo anti CD38 daratumumab (Dara). Zdravilo je v Sloveniji registrirano za začetno zdravljenje bolnikov, ki so primerni za aPKMC v kombinaciji z bortezomibom, talidomidom in deksametazonom. V raziskavi, kjer so kombinacijo Dara-VTd primerjali s kombinacijo VTd (CASSIOPEA) so ugotovili, da se podaljša PFS in se nakazuje tudi podaljšanje OS. Boljše in globlje odzive na zdravljenje za Dara VRd v primerjavi z VRd in podaljšanje PFS je pokazala raziskava faze 2 GRIFFIN. Raziskava faze 3 PERSEUS je potrdila dober učinek dodatka Dara k VRd (CR 87,9% vs. 70,1 %; boljše celokupno preživetje; boljši 4 letni PFS 84.3% vs. 67.7%; več MRD neg., vendar več z zdravljenjem povezanih stranskih učinkov 57% vs. 49.3%). V sklopu študije so prejeli Dara VRd 4 cikle pred in 2 ciklusa po avtoPKMC in nato vzdrževalno Dara-R do progressa bolezni.

Verjetno bodo kombinacije štirih zdravil v prihodnosti postale standard zdravljenja (v kolikor bo to finančno vzdržno), vendar so zaenkrat, dokler jasno ne dokažejo pozitivnega vpliva na OS, nekako rezervirane za bolnike z velikim tveganjem (double ali triple-hit DP). Ker tudi daratumumab negativno vpliva na mobilizacijo in zbiranje KMC, moramo zdravljenje z njim prekiniti vsaj 3 tedne pred mobilizacijo.

Za bolnike s plazmacelično levkemijo (>5% plazmatk v DKS ob potrjenem DP v KM) ali obsežno ekstramedularno boleznijo (1-2% ob začetni prezentaciji; 8% ob relapsu) v začetnem zdravljenju lahko uporabimo kombinacijo tarčnih zdravil in kemoterapevtikov. Pri nas uporabljamo shemo VDT-PACE (bortezomib, deksametazon, talidomid, cisplatin, doksorubicin, ciklofosamid in etopozid). Kombinacija je zelo toksična in ob zdravljenju z njo lahko pričakujemo pogoste zaplete. Bolniki nato nadaljujejo zdravljenje z aPKMC, v redkih primerih tudi alogenično PKMC (pretehtati pri mlajših bolniki z agresivno boleznijo; velika smrtnost povezana z zdravljenjem 10-20% in možnost GVHD).

Začetno zdravljenje bolnikov, ki niso primerni za aPKMC

Starost 70 let ni absolutna kontraindikacija za zdravljenje z aPKMC, pogosto bolniki niso primerni tudi zaradi pridruženih bolezni.

Prva izbira zdravljenje je tudi pri teh bolnikih, če se odločimo za trojno kombinacijo zdravil, VRd (standardno in veliko tveganje). Zdravimo 8-12 krogov in nato nadaljujemo z vzdrževalnim zdravljenjem. V kolikor so bolniki težko pokretni, lahko bortezomib zamenjamo z iksazomibom in se tako prihranimo bolniku tedensko obiskovanje ambulate. Pri starejših in krhkejših bolnikih zmanjšamo začetni odmerek lenalidomida in deksametazona (začetni odmerek 20 mg 1x tedensko; po 4-6 ciklih dodatno znižanje tedenskega odmerka; ukinitvev po 1 letu uporabe).

Za bolnike, ki niso primerni za aPKMC je v Sloveniji registrirana tudi kombinacija Dara z lenalidomidom in deksametazonom- DRd. V tem primeru naj bi bolnik prejel zdravljenje kontinuirano vse do napredovanja bolezni, tako kot prej kombinacijo samo lenalidomida in

deksametazona- Rd, ki jo pogosto uporabimo, ko se pri krhkih starejših bolnikih odločimo za kombinacijo le dveh zdravil.

Ena od možnosti zdravljenja so tudi kombinacije z alkilirajočimi zdravili- melfalanom ali ciklofosfamidom. Pri starejših dokaj pogosto uporabljamo kombinacijo bortezomiba, melfalana in metilprednizolona- VMP. Tem zdravilom lahko dodamo daratumumab – kombinacija Dara-VMP in je registrirana v Sloveniji. Raziskava ALCYONE je pokazala boljši PFS in OS pri bolnikih, ki so prejeli to kombinacijo (CR D-VMP 43% vs. 24% VMP).

Vzdrževalno zdravljenje

Vzdrževalno zdravljenje je indicirano za vse bolnike po aPKMC in za tiste, ki zanj niso primerni in so v začetnem zdravljenju prejeli omejeno število krogov zdravljenja (8-12). Za večino bolnikov je standardno vzdrževalno zdravljenje z lenalidomidom. Dokazano je, da podaljša OS v primerjavi z bolniki, ki vzdrževanja niso prejeli. Priporočeni odmerek je 10 mg dnevno, dajemo ga lahko neprekinjeno ali s tedenskimi premori, saj raziskave niso pokazale razlike v učinkovitosti. Optimalno trajanje vzdrževalnega zdravljenja z lenalidomidom je predmet razprave, najnovejši podatki pa kažejo, da je smiselno zdraviti vsaj 3, do največ 4 leta, če bolnik zdravljenje prenaša. Vzdrževalno zdravljenje z lenalidomidom je namreč povezano z 2-3x večjim tveganjem za nastanek sekundarnih rakov.

Pri bolnikih z DP z velikim tveganjem vzdrževanje z lenalidomidom nima tako jasne dobrobiti kot pri bolnikih z majhnim in srednjim tveganjem. Predvsem pri bolnikih z del 17 zato večkrat uporabimo vzdrževanje z bortezomibom ali kombinacijo obeh zdravil pri bolnikih z double ali triple- hit DP.

Literatura

1. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2022 Aug;97(8):1086-1107.
2. Côté J, Kotb R, Bergstrom DJ, LeBlanc R, Mian HS, Othman I, Louzada ML. First Line Treatment of Newly Diagnosed Transplant Ineligible Multiple Myeloma: Recommendations from the Canadian Myeloma Research Group Consensus Guideline Consortium. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2023 May;23(5):340-354. doi: 10.1016/j.clml.2023.01.016. Epub 2023 Feb 3. PMID: 36925389.
3. American Society of Hematology. (2023). Daratumumab Plus Bortezomib, Lenalidomide, and Dexamethasone (VRd) Outperforms VRd Alone for Multiple Myeloma. Dostopno na <https://www.hematology.org/newsroom/press-releases/2023/lba1>.
4. Multiple myeloma Hub. Latest updates on the Myeloma XI trial from ASH 2022 (2023). Dostopno na: <https://multiplemyelomahub.com/medical-information/latest-updates-on-the-myeloma-xi-trial-from-ash-2022>

Vloga reševalne »salvage« avtologne presaditve krvotvornih matičnih celic pri bolnikih z relapsom diseminiranega plazmocitoma

Luka Čemažar, Petra Pavlovčič, Matevž Škerget, Barbara Skopec

Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana.

Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana.

luka.cemazar@kclj.si

Uvod

V luči novodobne in tarčne terapije, ki se uporablja pri zdravljenju diseminiranega plazmocitoma, se postavlja vprašanje o učinkovitosti reševalne avtologne presaditve krvotvornih matičnih celic (aPKMC). Odločitev je odvisna od več dejavnikov, vendar se najpogosteje zanjo odločimo, če je od zadnje aPKMC minilo več kot 36 mesecev v primeru, da je pacient po tej aPKMC prejemal vzdrževalno zdravljenje ali pa 24 mesecev v primeru, da ga ni prejemal. Kljub številnim raziskavam, je malo randomiziranih, ki bi neposredno primerjale reševalno aPKMC in kontinuirano zdravljenje, poleg tega imajo te raziskave nasprotujoče si zaključke. Na primer, v raziskavi nemške skupine GMMG ReLApsE ni bilo statistično značilne razlike niti v preživetju brez napredovanja bolezni (PFS - mediana 19,3 proti 20,5 meseca) niti v skupnem preživetju (OS - mediana 62,7 proti 67,1 meseca). Nasprotno pa rezultati raziskav nekaterih ustanov v Evropi kažejo na koristi reševalne PKMC.

Lastne izkušnje kliničnega oddelka za hematologijo UKC Ljubljana

V opazovanem obdobju med letoma 2008 in 2023, z mediano celokupnega spremljanja od postavitve diagnoze 87,5 mesecev (36-195), smo analizirali skupno 78 bolnikov pri katerih smo

opravili reševalno aPKMC. Mediana starosti je bila 62 let, od tega je bilo 32 % žensk. Neugodne citogenetske spremembe je imelo manjše število bolnikov(36 %).

Pri večini bolnikov je šlo za skupno drugo presaditev, nekateri (7/78) so imeli pred tem v prvi liniji zdravljenja opravljeno tandemsko presaditev .

Pri večini bolnikov (81 %) smo se pred reševalno aPKMC odločili za reindukcijsko zdravljenje, manjši delež bolnikov (19 %) pa je prejel reševalno aPKMC neposredno ob ponovitvi. Vsaj dve liniji predhodnega zdravljenja je prejelo 55 % bolnikov, ≥ 3 linije zdravljenja pred reševalno aPKMC je prejelo 26 % bolnikov .

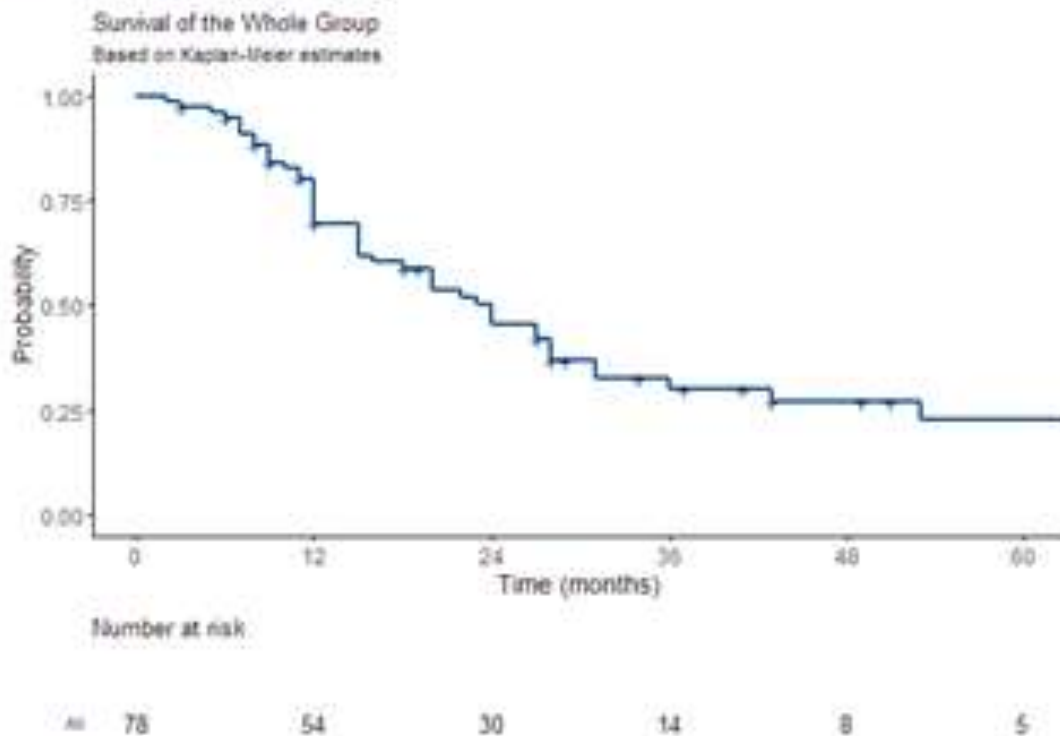
Cross Table for Dependent spol								
	N	M (N=53)		Ž (N=25)		Test Statistic		
Čas do naslednje tx	78	36.3	47.0	72.7	37.3	46.0	56.7	$F_{1,76}=0.05, P=0.83^3$
Starost ob tx2	78	56.0	64.0	68.0	57.7	62.0	68.3	$F_{1,76}=0.00, P=0.94^3$
Citogenetika : standard	72	0.6	30/49		0.7	16/23		$\chi^2_1=0.47, P=0.49^2$
Terapija pred 2. tx : NE	77	0.2	10/52		0.2	5/25		$\chi^2_1=0.01, P=0.94^2$
Več kot 2 liniji zdravljenja : 1	78	0.2	13/53		0.3	8/25		$\chi^2_1=0.48, P=0.49^2$
Smrt : 1	76	0.3	17/51		0.2	6/25		$\chi^2_1=0.69, P=0.41^2$
Relaps : 1	78	0.5	29/53		0.6	15/25		$\chi^2_1=0.19, P=0.66^2$
Starost nad >60 let : 1	76	0.6	32/52		0.6	15/24		$\chi^2_1=0.01, P=0.94^2$

N is the number of non-missing value. ¹Kruskal-Wallis. ²Pearson. ³Wilcoxon.

Mediana časa do naslednje transplantacije (TTT) je bila 46 mesecev (21-163).

Mediana celokupnega preživetja (OS) od postavitve diagnoze je bila 141 mesecev (11,8 let), s 6-letnim preživetjem od postavitve diagnoze 94 %. Mediana OS po reševalni PKMC je bila 76 mesecev, mediana časa do napredovanja bolezni (PFS) po reševalni PKMC 24 mesecev.

Survival Plot

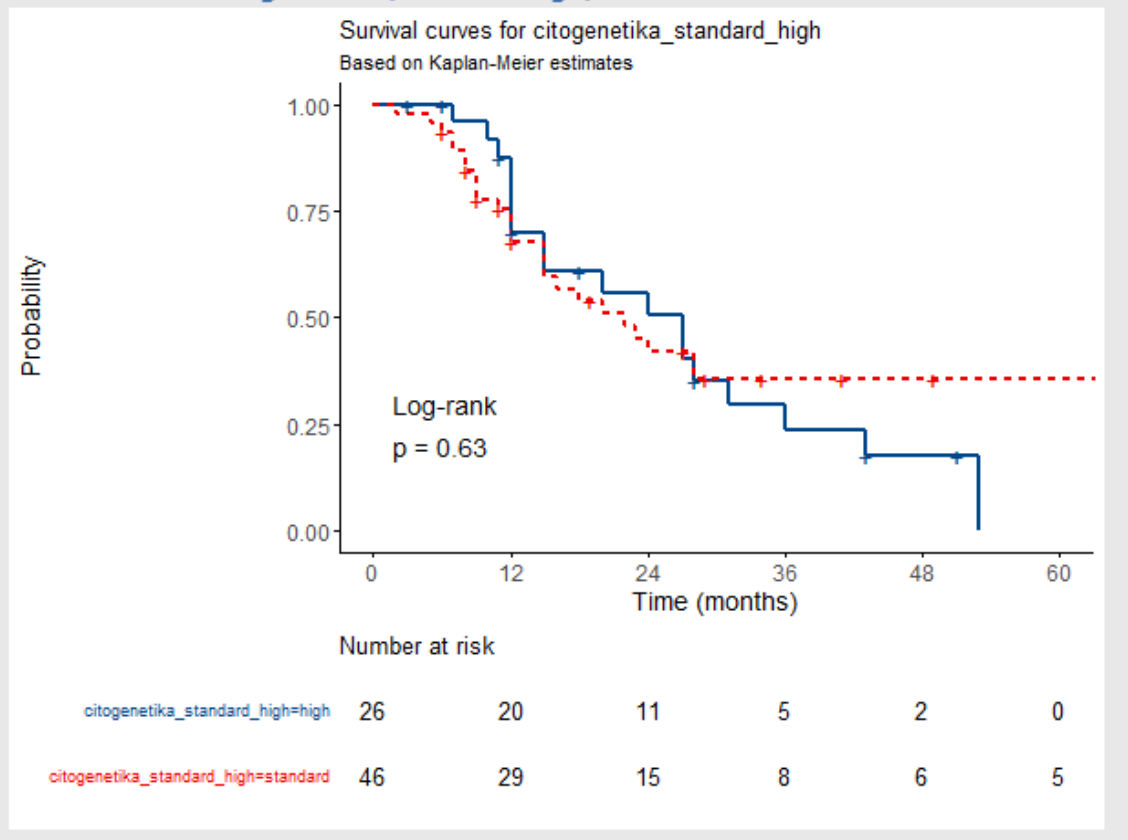


Slika 1 mPFS po reševalni aPKMC

PR ali VGPR na D+100 je doseglo skupaj vsaj 84 % bolnikov. V obdobju po reševalni PKMC smo zabeležili 63 % relapsov in 31 % smrti.

V rezultatih nismo zaznali statistično pomembne razlike v PFS ali OS med standardno in citogenetskimi spremembami z visokim tveganjem (PFS pri 36ih mesecih 36 % proti 24 %). Prav tako ni bilo razlik glede starosti (nad ali pod 60 let) ali glede na število prejetih linij (1-2 ali ≥ 3). TTT več kot 36 mesecev prav tako ni kazal statistično pomembnega vpliva, kot je sicer opisan v literaturi.

Survival Plot - Citogenetika (standard/high)



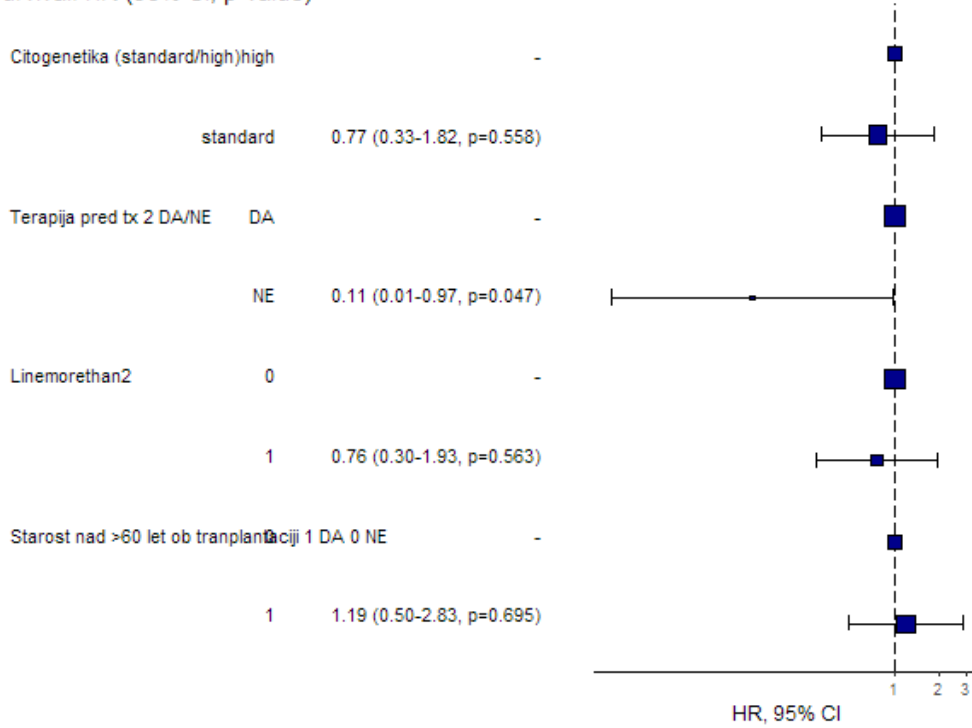
Slika 2 mPFS glede na citogenetske spremembe

Kot zanimivost smo opazili, da so imeli bolniki, ki pred presaditvijo niso prejeli reindukcijskega zdravljenja, statistično manjše tveganje za dogodek (smrt): HR (razmerje tveganj) = 0,11 (0,01-0,97 CI 95 %, p = 0,047). To lahko delno razložimo s počasnimi biokemičnimi ponovitvami z majhnim bremenom bolezni brez prizadetosti tarčnih organov

Hazards Regression Plot

[3]

Survival: HR (95% CI, p-value)

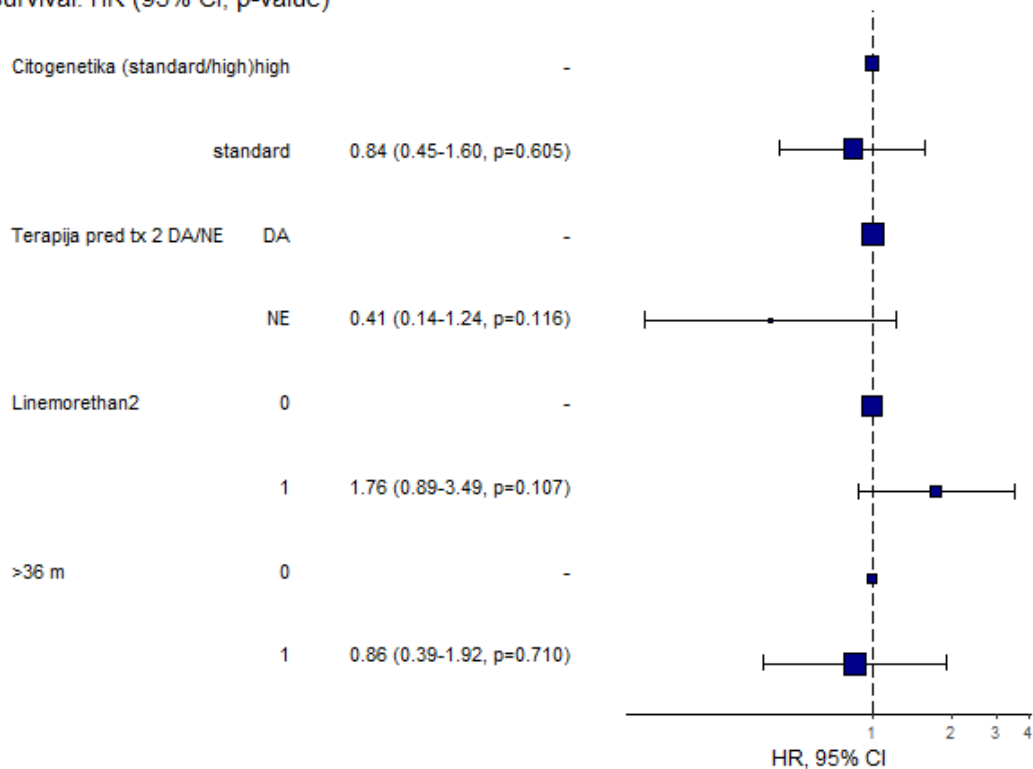


Slika 3 HR OS

Hazards Regression Plot

[3]

Survival: HR (95% CI, p-value)



Slika 4 HR PFS

Zaključek

Podatki, ki smo jih zbrali, prikazujejo izkušnje transplantacijskega centra UKC Ljubljana. Ugotavljamo podobno kot drugod po svetu, tako da težko potrdimo absolutne prednosti aPKMC ob ponovitvi bolezni, v primerjavi z zdravljenjem z novejšimi tarčnimi zdravili.

Literatura:

1. Shah N, Ahmed F, Bashir Q, Qureshi S, Dinh Y, Rondon G, et al. Durable remission with salvage second autotransplants in patients with multiple myeloma. *Cancer*. 2012 Jul 15;118(14):3549–55.
2. Cook G, Williams C, Brown JM, Cairns DA, Cavenagh J, Snowden JA, et al. High-dose chemotherapy plus autologous stem-cell transplantation as consolidation therapy in patients with relapsed multiple myeloma after previous autologous stem-cell transplantation (NCRI Myeloma X Relapse [Intensive trial]): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Jul;15(8):874–85.
3. Goldschmidt H, Baertsch M-A, Schlenzka J, Becker N, Habermehl C, Hielscher T, et al. Salvage autologous transplant and lenalidomide maintenance vs. lenalidomide/dexamethasone for relapsed multiple myeloma: the randomized GMMG phase III trial ReLApSE. *Leukemia*. 2021 Apr;35(4):1134–44.
4. Mangiacavalli S, Derudas D, Belotti A, Zamagni E, Paris L, Pavone V, et al. Salvage Autologous Stem Cell Transplant for the Treatment of First Relapse Multiple Myeloma: Evidence of Its Clinical Role from a Multicenter Italian Study. *Blood*. 2023 Nov 28;142(Supplement 1):2226.
5. Khan S, Reece D, Atenafu EG, Bhella S, Chen C, Masih-Khan E, et al. Post Salvage Therapy Autologous Transplant for Relapsed Myeloma, Ongoing Relevance within Modern Treatment Paradigms? *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2023 Feb;23(2):e97–106.

Naše izkušnje z bispecifičnimi protitelesi pri diseminiranem plazmocitomu

Gorazd Jakoš, Karla Rener

Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana

Gorazd.jakos@kclj.si

UVOD

S prihodom sodobnih zdravil za zdravljenje diseminiranega plazmocitoma (DP), ki vključujejo proteasomske inhibitorje (PI), imunomodulirajoča zdravila (IMiD) in anti-CD38 protitelesa smo pomembno podaljšali preživetje bolnikom z DP, vendar se sedaj soočamo z bolniki, ki imajo t.i. pentarefrakturno bolezen, pri kateri potrebujemo nove možnosti zdravljenja. Rezultati CAR-T celičnega zdravljenja takšnih bolnikov so spodbudni, vendar v Sloveniji zdravljenje še ni na voljo. Zato smo bili toliko bolj veseli programa sočutne uporabe bispecifičnih protiteles, ki so druga uspešna možnost zdravljenja ponovljenih/napredovalih oblik DP. V okviru sočutne uporabe smo imeli na Kliničnem oddelku za hematologijo (KOH) na voljo elranatamab in talquetamab. Zdravilo je prejelo celokupno 8 bolnikov. V nadaljevanju predstavljamo prve izkušnje zdravljenja z obema bispecifičnima protitelesoma. V času pisanju prispevka, pa smo dobili že možnost zdravljenja s prvim registriranim bispecifikom, teklistamabom.

BISPECIFIČNA PROTITELESA PRI ZDRAVLJENJU DP

Anti BCMA protitelesa

Elranatamab in teclistamab sta humanizirani bispecifični protitelesi, katerih tarčo predstavlja BCMA (B-cell maturation antigen). Ta je visoko izražen na aberantnih malignih plazmatkah in predstavlja tarčo tudi za učinkovine iz drugih skupin (belantamab mafodotin, idecabtagene vicleucel (ide-cel), ciltacabtagene autoleucel (cilta-cel). Elranatamab veže BCMA na plazmatkah in

CD3 na T limfocitih, ter tako aktivira in sproži citotoksični odziv T-limfocitov proti malignim plazmatkam. Tako elranatamab kot teclistamab sta se v kliničnih raziskavah pri bolnikih z napredovalim/ponovljenim, trojno rezistentnim DP izkazala z visoko stopnjo celokupnega odgovora. V klinični raziskavi z elranatamabom je celokupni odgovor na zdravljenje doseglo 61% bolnikov, 35% bolnikov najmanj CR, od tega 60% MRD (ang. minimal residual disease) negativen status (1). Pogosti neželeni učinki so bili: okužbe (70%), sindrom sproščanja citokinov (CRS) (57%) ter citopenije (1). V raziskavi s teclistamabom je celokupni odgovor doseglo 63% bolnikov, skoraj 40% CR ali boljši dogovor, 27% bolnikov je doseglo MRD negativen status (2). Citopenije in okužbe so bile pogoste; prav tako CRS (72%), vendar večinoma stopnje 1 ali 2 (2).

Anti GPRC5D protitelo

Talquetamab je bispecifično IgG4 protitelo, ki veže GPRC5D (ang. G protein–coupled receptor, family C, group 5) receptor na plazmocitomskih celicah in CD3, s čimer prav tako aktivira T-celični citotoksični odziv proti malignim plazmatkam (3). V raziskavi faze 1. je po 11,7 mesecih zdravljenja v skupini z nižjim odmerkom celokupni odgovor doseglo 70% bolnikov (3). CRS, prizadetost kože, nohtov in disgeuzija so bili pri zdravljenju s talquetamabom pogosti, vendar nizke stopnje (3).

VKLJUČITVENI KRITERIJI SOČUTNE UPORABE ELRANATAMABA IN TALQUETAMABA

Za zdravljenje v sklopu sočutne uporabe smo lahko kandidirali odrasle bolnike (≥ 18 let), ki so izpolnjevali vključitvene kriterije, ki se med obema zdraviloma niso bistveno razlikovali zato so predstavljeni združeno. Poleg potrjene diagnoze diseminiranega plazmocitoma po IMWG kriterijih, so bolniki morali imeti aktivno bolezen oz. napredovanje bolezni, rezistenco na PI, IMiD in antiCD-38 protitelo. Hkrati niso smeli imeti možnosti vključitve v katero od kliničnih študij, biti predhodno izpostavljeni anti-BCMA bispecifiku, drugemu študijskemu zdravilu ali živemu cepivu znotraj 4 tednov. Pri bolnikih so bili zahtevani: ECOG ≤ 2 , odsotnost akutnih toksičnih učinkov

predhodnih zdravljenj (CTCAE grade ≤ 1), t.i. »washout« perioda po predhodnih zdravljenjih, zadovoljivo jetrno in ledvično delovanje, zadovoljiva funkcija kostnega mozga (absolutno število levkocitov $\geq 1.0 \times 10^9/L$, trombocitov ≥ 25 oz. $50 \times 10^9/L$ pri elranatamabu oz. talquetamabu, Hb ≥ 80 g/L), izključene druge plazmacelične diskrazije. Bolniki niso smeli biti po avto oz. alo presaditvi kostnega mozga v zadnjih 3-6 mesecih, imeti aktivne reakcije presadka proti gostitelju, prizadetosti centralnega živčnega sistema, klinično pomembne kardiovaskularne ali nevrološke prizadetosti, preobčutljivosti na omenjeni zdravili, aktivne okužbe s HBV, HCV, SARS-CoV2 ali HIV, sočasnega aktivnega rakavega obolenja. Zagotovljena je morala biti zmožnost obravnave CRS in ICANS ter dostop do tocilizumaba.

REZULTATI SOČUTNE UPORABE ELRANATAMABA IN TALQUETAMABA

V obdobju od 27.3.2023 do 1.9.2023 smo v program sočutne uporabe z bispecifičnimi protitelesi vključili 8 bolnikov. 5 bolnikov je prejelo elranatamab, 3 bolniki pa talquetamab (Slika1).

Elranatamab

Povprečna starost bolnikov je bila 66 let. Vsi so bili moškega spola. Predhodno so mediano prejeli 5 linij zdravljenja. Pri treh bolnikih (60%) je bila ob diagnozi ugotovljena neugodna citogenetika. Aplikacija je potekala skladno s protokolom zdravljenja, ki je določal premedikacijo (deksametazon, antihistaminik in antipiretik) ter postopno zviševanje odmerkov elranatamaba. Vsi bolniki so bili do prejema polnega odmerka hospitalizirani. Pri nobenem bolniku nismo beležili CRS, ICANS ali okužbe. Kasneje so 4 bolniki imeli okužbo, 2 respiratorni okužbi gradusa 3. Vsi bolniki so imeli med zdravljenjem citopenije gradusa 3: nevtropenija $< 1.0 \times 10^9/L$ (40%), anemija < 80 g/L (80%), limfopenija $< 0.5 \times 10^9/L$ (80%) ter trombocitopenija $< 50 \times 10^9/L$ (60%). Mediano trajanje zdravljenja je bilo 2,9 meseca (Slika 1). Pri štirih bolnikih je bolezen napredovala. Trije bolniki so v umrli zaradi napredovanja bolezni, med temi je bolnik št. 1 (Slika1) zaradi kritičnih citopenij v prvem mesecu zdravljenja izgubil možnost zdravljenja. Bolnik št.4. (Slika1) je po 5 mesecih zdravljenja dosegel PR, vendar je umrl zaradi nenadne srčne smrti ob znani ishemični

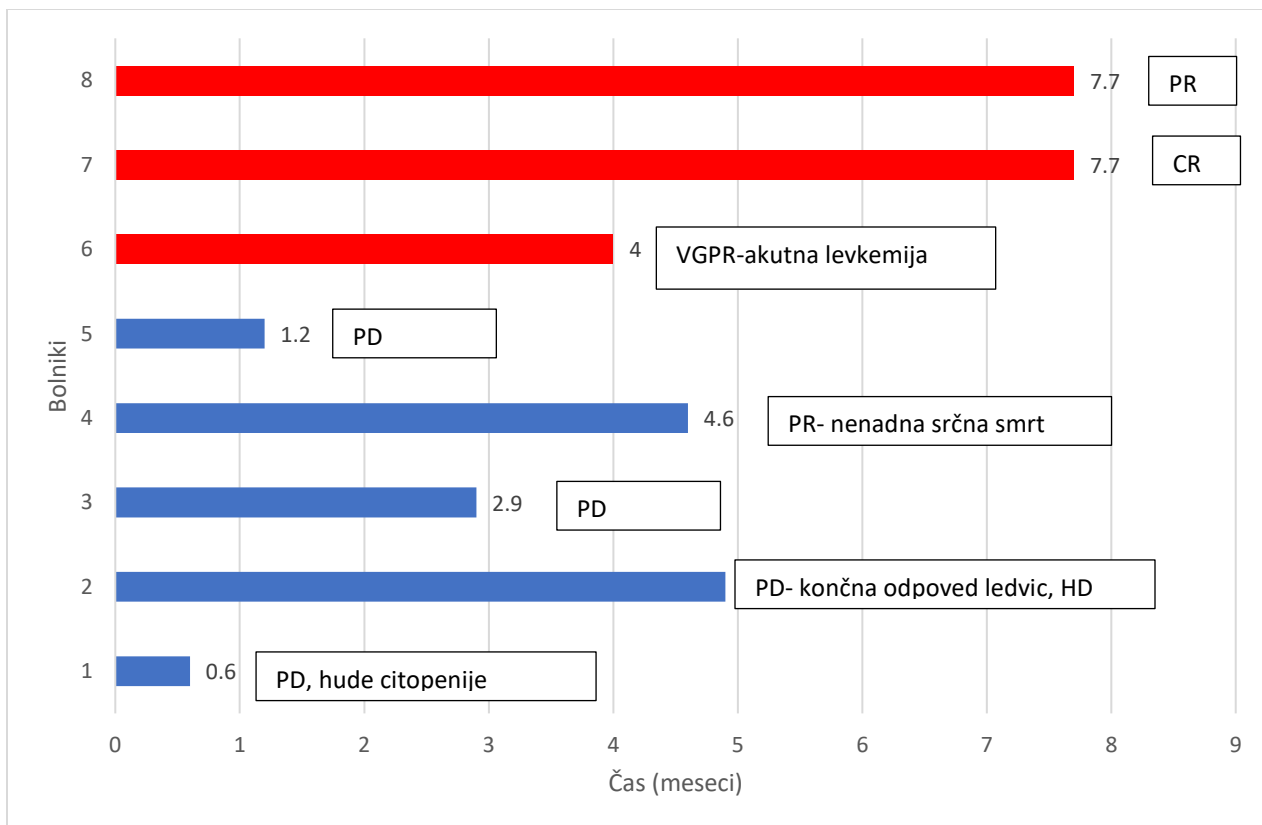
bolezni srca. Pri bolniku št.2 (Slika1) se je ob napredovanju DP razvila končna odpoved ledvic in se zdravi s hemodializo.

Talquetamab

Povprečna starost 3 bolnic je bila 69 let. Predhodno so mediano prejele 5 linij zdravljenja. Dve bolnici sta imeli ob diagnozi ugotovljene neugodne citogenetske spremembe. Aplikacija je potekala skladno s protokolom zdravljenja, ki je določal premedikacijo (deksametazon, antihistaminik in antipiretik) ter postopno zviševanje odmerkov talquetamaba. Vse bolnice so bile do prejema polnega odmerka zdravila hospitalizirane. Pri eni bolnici smo prvi dan po aplikaciji beležili CRS gradusa 1. Povišana telesna temperatura je izzvenela ob podpornih ukrepih. ICANS ali okužbe med uvedbo zdravljenja nismo beležili. V nadaljevanju zdravljenja sta dve bolnici utrpeli okužbe gradusa 1-2. Vse bolnice so bile limfopenične z vrednostmi $< 0.5 \times 10^9/L$. Prav tako so vse bolnice poročale pojav t.i. »on-tumor off-target« neželene učinka zdravljenja z bolečinami ter luščenjem kože po blazinicah prstov rok in stopal, spremembo nohtov ter spremenjenost oziroma izgubo okusa. Pri 2 bolnicah smo po 7 mesecih prejemanja beležili CR oz. PR. Obe bolnici nadaljujeta s terapijo. Bolnica št.6 (Slika1) je po 4 mesecih dosegla VGPR, vendar je kontrolna punkcija kostnega mozga, ki smo jo opravili zaradi citopenij, pokazala razvoj sekundarne akutne levkemije.

ZAKLJUČEK

Pri majhni skupini bolnikov, ki smo jih zdravili z obema bispecifikoma, smo beležili slabši celokupni odgovor na zdravljenje kot v registracijskih študijah. Vsi bolniki so bili pentarefraktorni, kar jih že izhodiščno uvršča v skupino s slabšo prognozo (1). Zabeležili smo le en primer CRS gradusa 1. V nadaljevanju zdravljenja je 6 od 8 bolnikov utrpelo okužbe. Vse bolnice v skupini s talquetamabom so utrpeli prizadetost kože, nohtov in okusa, ki pa se je z nadaljevanjem zdravljenja omilila. Ocenjujemo, da bomo ob uvedbi bispecifičnih protiteles v redno klinično prakso zdravili bolnike z boljšimi prognostičnimi dejavniki in tako dosegali tudi boljše odgovore na zdravljenje. Obvladovanje toksičnosti v obliki CRS in ICANS je bilo uspešno kot tudi zdravljenje okužb.



PR-delni odgovor, CR-kompletni odgovor, VGPR-zelo dober delni odgovor, PD- napredovala bolezen, HD-hemodializa

Slika 1: Čas trajanja zdravljenja z bispecifičnima protitelesoma (talquetamab-rdeči stolpič, elranatamab-modri stolpič) v mesecih ter izhodi zdravljenja.

Literatura:

1. Lesokhin AM, Tomasson MH, Arnulf B et al. Elranatamab in relapsed or refractory multiple myeloma: phase 2 MagnetisMM-3 trial results. *Nat Med.* 2023 Sep;29(9):2259-2267. doi: 10.1038/s41591-023-02528-9. Epub 2023 Aug 15. PMID: 37582952; PMCID: PMC10504075.
2. Moreau P, Garfall AL, van de Donk NWCJ et al. Teclistamab in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2022 Aug 11;387(6):495-505. doi:

10.1056/NEJMoa2203478. Epub 2022 Jun 5. PMID: 35661166; PMCID:
PMC10587778.

3. Chari A, Minnema MC, Berdeja JG, Oriol A, et al. Talquetamab, a T-Cell-Redirecting GPRC5D Bispecific Antibody for Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2022 Dec 15;387(24):2232-2244. doi: 10.1056/NEJMoa2204591. Epub 2022 Dec 10. PMID: 36507686.

Ukrepanje pri sopojavih ob zdravljenju z bispecifičnimi protitelesi

Klara Šlajpah¹, Peter Fazarinc²

¹ KO za hematologijo, UKC Ljubljana

² Oddelek za hematologijo in onkologijo, SB Celje

klara.slajpah@kclj.si

Bispecifična protitelesa (bsAbs) so inženirsko izdelane hibridne molekule z dvojno vezavno zmogljivostjo. Eden od epitopov je specifičen za T limfocite in je pri vseh trenutno odobrenih bsAbs CD3. Druga domena veže antigen, specifičen za plazmocitomske celice (PC). Pri teklistamabu (TEC, edini trenutno na voljo v Sloveniji) in elranatamabu je druga vezavna domena usmerjena proti antigenu B-celičnega dozorevanja (BCMA - B cell maturation antigen), medtem ko se talquetamab veže na GPRC5D (na G protein vezan receptor razreda C, skupina 5, član D). Z vezavo na CD3 in ciljni antigen na PC se tvori imunološki most, ki vodi do uničenja tumorskih celic s strani "aktivirane" imunske efektorske celice s posledičnim sproščanjem citokinov in kateholaminov.

BsAbs so povezana z edinstvenim profilom neželenih učinkov, ki so lahko resni in potencialno življenjsko nevarni, če jih ne obravnavamo in zdravimo takoj. Zato je potrebno, da so bolniki za uvedbo terapije sprejeti v bolnišnico za 7 do 9 dni, odvisno od vrste bsAbs. Trajanje hospitalizacije se lahko podaljša, če se pojavijo resni zapleti.

Sindrom sproščanja citokinov

Najpomembnejši varnostni dejavnik pri bsAbs je sindrom sproščanja citokinov (CRS), ki je posledica prekomerne aktivacije imunskega sistema. BsAbs podobno kot terapija s CAR-T celicami, povzročajo lokalno sproščanje citokinov, kar vodi v proizvodnjo različnih provnetnih citokinov. Posledično pride do privabljanja monocitov in ojačitve vnetne zanke v kateri ima glavno vlogo IL-6. Nastanejo sistemski znaki prekomerne aktivacije imunskega sistema. CRS se običajno pojavi po začetnem odmerjanju in je manj pogost pri naslednjih odmerkih. Za zmanjšanje tveganja za

nastanek CRS se uporabljajo sheme postopnega odmerjanja. Čeprav se odmerjanje razlikuje glede na posamezno bsAbs, je splošni pristop podoben: dva ali trije manjši odmerki, vsak v razmaku približno treh dni, ki se zaključijo z odmerkom, ki se uporablja v nadaljevanju zdravljenja. Pri vseh so priporočena zdravila pred zdravljenjem deksametazon, antagonist histamin-1 receptorjev in antipiretik. Kljub temu je CRS še vedno razmeroma pogost, saj se pojavi pri 50 % do 75 % bolnikov. Pri TEC (MajesTEC-1 študija faze I/II, n = 157) se je CRS pojavil pri 57 % do 70 % bolnikov, vsi dogodki so bili stopnje 1–2. Za CRS značilni simptomi so vročina, mrzlica, utrujenost in anoreksija in lahko prerastejo v huda stanja, kot so hipotenzija, hipoksija in motnje v delovanju organov. Čeprav so ti učinki resni, so običajno reverzibilni. Srednji čas do pojava in srednje trajanje CRS sta po podatkih za TEC dva dni (od 1 do 6 dni). Diagnoza CRS temelji na klinični oceni in izključitvi drugih bolezni, kot so okužbe, ob spremljanju vnetnih označevalcev, kot so feritin, in CRP, ki so običajno povišani, vendar niso značilni za CRS. Zdravljenje pogosto vključuje zaviranje IL-6 (npr. tocilizumab ali siltuksimab) in kortikosteroide, odvisno od resnosti CRS, ki je pri bsAbs v primerjavi s terapijami CAR-T običajno blažja. Zdravljenje (TEC) brez prekinitev so nadaljevali vsi bolniki s CRS, podporne ukrepe, vključno s tocilizumabom (36 %), glukokortikoidi (8,5 %) in vazopresorji (1 %), pa je prejelo 67 % bolnikov.

Stopnja	Simptomi	Tocilizumab	Kortikosteroidi
Stopnja 1 prenehaj z bsAbs dokler CRS	Temperatura 38°C	Razmisli o uporabi	Ni smiselno
Stopnja 2 prenehaj z bsAbs dokler CRS	Temperatura 38°C in <ul style="list-style-type: none"> hipotenzija, ki se izboljša po dodajanju tekočin ali potreba po dodajanju kisika z majhnim pretokom 	Tocilizumab 8 mg/kg z intravensko infuzijo, ki traja 1 uro (odmerek naj ne presega 800 mg). Po potrebi vsakih 8 ur, če ni odziva na intravensko dodajanje tekočin ali povečano dodajanje kisika (največ 3 odmerki v 24-urnem obdobju in skupno največ 4)	Če v 24 urah po tocilizumabu ni izboljšanja deksametazon 10 mg IV na 6 ur, dokler se reakcija ne umiri do stopnje 1 ali manj, nato zmanjševati v obdobju 3 dni
Stopnja 3 prenehaj z bsAbs dokler CRS če se ponovi stopnja 3 ali stopnja 3 48 h dokončno ukini bsAbs	Temperatura 38°C in <ul style="list-style-type: none"> hipotenzija, ki zahteva uporabo enega vazokonstriktorja z vazopresinom ali brez njega ali potreba po dodajanju kisika z visokim pretokom 	Tocilizumab 8 mg/kg z intravensko infuzijo, ki traja 1 uro (odmerek naj ne presega 800 mg). Po potrebi vsakih 8 ur, če ni odziva na intravensko dodajanje tekočin ali povečano dodajanje kisika (največ 3 odmerki v 24-urnem obdobju in skupno največ 4)	Če ni izboljšanja deksametazon 10 mg IV na 6 ur, dokler se reakcija ne umiri do stopnje 1 ali manj, nato zmanjševati v obdobju 3 dni
Stopnja 4 dokončno ukini bsAbs	Temperatura 38°C in <ul style="list-style-type: none"> hipotenzija, ki zahteva uporabo več vazokonstriktorjev (razen vazopresina) ali potreba po dodajanju kisika z ventilacijo s pozitivnim tlakom, intubacija ali mehanska ventilacija 	Tocilizumab 8 mg/kg z intravensko infuzijo, ki traja 1 uro (odmerek naj ne presega 800 mg). Po potrebi vsakih 8 ur, če ni odziva na intravensko dodajanje tekočin ali povečano dodajanje kisika (največ 3 odmerki v 24-urnem obdobju in skupno največ 4)	Kot navedeno zgoraj, ali metilprednizolon 1000 mg na dan IV 3 dni. Če ni izboljšanja ali poslabšanje, razmisli o uporabi drugih imunosupresivnih zdravil

Tabela 1: Stopnje CRS in ukrepanje

Nevrotoksičnost

Mehanizem nevrotoksičnosti (ICANS – immune effector cell associated neurotoxicity syndrome) povezane z anti-BCMA terapijo ni povsem znan, vendar se domneva, da gre za toksičnost, ki je posledica delovanja na »zunaj tarčne« antigene. Obstajajo dokazi, ki kažejo, da BCMA morda ni

prisoten izključno v krvotvornem sistemu, temveč tudi v živčnem sistemu. Poleg ICANS se pri bolnikih lahko pojavi tudi pozna nevrotoksičnost (NT), ki ni ICANS in se kaže kot gibalne in nevrokognitivne težave, ki so pogosto nepovratne ter lahko vključujejo simptome, ki spominjajo na parkinsonizem. Večina NT dogodkov je blagih do zmernih (stopnje 1-2). Najpogostejši simptom je glavobol, sledijo motorična disfunkcija, senzorična nevropatija, tremor, letargija in encefalopatija. Večina primerov ICANS se pojavi v obdobju postopnega odmerjanja ali začetnem polnem odmerku zdravljenja, pri čemer je mediani čas do pojava štiri dni, mediana trajanja pa tri dni. Podporno zdravljenje zaradi NT je bilo v MajesTEC-1 študiji potrebno pri 8,5 % bolnikov in je vključevalo tocilizumab (2 %), glukokortikoide (2 %), levetiracetam (1,2 %) in gabapentin (0,6 %).

Stopnja	Simptomi	Sočasen CRS	Brez pridruženega CRS
Stopnja 1 prenehaj do kler ICAN 5	Ocena ICE 7-9 ali zmanjšana stopnja zavesti: bolnik se zbudi spontano	Po navodilih v tabeli 1. Spremljaj nevrološke simptome, razmisli o nevrološkem pregledu	Spremljaj nevrološke simptome, razmisli o nevrološkem pregledu
Stopnja 2 prenehaj do kler ICAN 5	Ocena ICE 3-6 ali zmanjšana stopnja zavesti: bolnik se zbudi na glasen poziv	Tocilizumab po navodilih za CRS v tabeli 1. Če ni izboljšanja deksametazon 10 mg IV na 6 ur, dokler se reakcija ne umiri do stopnje 1 ali manj, nato postopno zmanjševanje	Deksametazon 10 mg IV na 6 ur, dokler se reakcija ne umiri do stopnje 1 ali manj, nato postopno zmanjševanje
Stopnja 3 prenehaj do kler ICAN 5	Ocena ICE 0-2 ali zmanjšana stopnja zavesti: bolnik se zbudi samo na taktilni stimulus ali epileptični napad: <ul style="list-style-type: none"> katerikoli klinični epileptični napad, lokaliziran ali generaliziran, ki se hitro umiri ali nekonvulzivni napad, opazen na EEG, ki izveni po intervenciji ali zvišan intrakranialni tlak: žariščni/lokalni edem, zaznan s slikovno metodo za prikaz živčevja	Tocilizumab po navodilih za CRS v tabeli 1. Ob prvem odmerku tocilizumaba dodati deksametazon 10 mg IV in nato vsakih 6 ur, dokler se reakcija ne umiri do stopnje 1 ali manj, nato postopno zmanjševanje	Deksametazon 10 mg IV na 6 ur, dokler se reakcija ne umiri do stopnje 1 ali manj, nato postopno zmanjševanje
Stopnja 4 do končno ukini bsAbs	Ocena ICE 0 ali zmanjšana stopnja zavesti: <ul style="list-style-type: none"> osebe ni mogoče zbuditi oziroma jo zbudi le močnejši ali večkratni taktilni stimulus ali stupor ali komo ali epileptični napad: <ul style="list-style-type: none"> življenjsko nevaren dolgotrajen epileptični napad (>5 minut) ali večkratni klinični napadi ali električni izbruhi brez vmesne umiritve na izhodiščno raven ali motorični znaki: <ul style="list-style-type: none"> globoka žariščna motorična oslabelost kot sta hemipareza ali parapareza ali zvišan intrakranialni tlak / možganski edem, z znaki/simptomi, kot so: <ul style="list-style-type: none"> difuzni možganski edem, zaznan s slikovno metodo za prikaz živčevja ali decerebracijski ali dekortikacijski položaj ali paraliza VI. možganskega živca ali edem papile vidnega živca ali Cushingova triada 	Tocilizumab po navodilih za CRS v tabeli 1. Postopati kot je navedeno zgoraj, ali ob prvem odmerku tocilizumaba metilprednizolon 1000 mg na dan IV in nato še 2 dni	Postopati kot navedeno zgoraj, ali razmisliti o metilprednizolonu 1000 mg na dan IV 3 dni. Če izboljšanje, postopati kot opisano zgoraj

Tabela 2: Stopnja in zdravljenje ICANS

Okužbe

Bolniki imajo zaradi pomembne in dolgotrajne imunosupresije večje tveganje za resne okužbe. BsAbs neselektivno uničijo zdrave plazmatke, kar povzroči hudo hipogamaglobulinemijo. Drugi dejavniki, ki prispevajo k okužbam so dolgotrajne citopenije, izčrpanost T limfocitov in izčrpane zaloge kostnega mozga zaradi osnove bolezni in prejšnjih zdravljenj. Poleg tega lahko hud CRS privede do stanja imunske paralize, kar še poveča dovzetnost za okužbe. Po podatkih iz študij ima okužbo približno 70 % bolnikov, od tega je pri 45 % resna (stopnje 3-4). Najpogostejše so okužbe dihal in sečil. Pri TEC so poročali o reaktivaciji virusnih okužb, kot so CMV, HBV, VZV in HSV. Srednji čas do okužbe po uvedbi bsAbs je 49 dni (mediana spremljanja 9 mesecev). Pred začetkom zdravljenja je potrebno opraviti presejalno testiranje za HBV, HCV, EBV, CMV in HIV. Pri prenašalcih HBV ali tistih, ki so ga imeli v preteklosti je potrebna uvedba entekavirja za celotno obdobje zdravljenja. Katerakoli aktivna ali neobvladana okužba je kontraindikacija za uvedbo terapije z bsAbs. Pri vseh bolnikih se priporoča protivirusna profilaksa z aciklovirjem ali valaciclovirjem od prvega dne zdravljenja. Prvi mesec zdravljenja in vsakič, ko je ANC nižji od 500/ μ L se priporoča profilaksa s fluorokinolonom in v obdobjih podaljšane in globoke nevtropenije protiglivična profilaksa s flukonazolom ali mikafunginom. Protiglivična profilaksa se svetuje tudi pri bolnikih, ki so prejeli tocilizumab, anakinro ali visoke doze kortikosteroidov. Vsi bolniki potrebujejo profilakso proti pnevmocisti, s katero pričnemo en teden po začetku zdravljenja. Zaradi hude hipogamaglobulinemije, ki se pojavi pri 70 % bolnikov, se svetuje profilaktična uporaba intravenskih imunoglobulinov, s katero začnemo ob začetku drugega ciklusa zdravljenja. Priporoča se cepljenje proti gripi, COVID-19 in pnevmokoku pred uvedbo zdravljenja. Pri bolnikih z znaki okužbe je indicirana uvedba empirične širokospektralne antibiotične terapije in ustrezna slikovna in mikrobiološka diagnostika.

Hematološka toksičnost

Citopenije so pogost neželeni učinek zdravljenja. Vzroki niso povsem jasni, vendar vključujejo več predhodnih zdravljenj, izhodiščno citopenijo, hipogamaglobulinemijo in predhodno presaditev krvotvornih matičnih celic. V MajesTEC-1 študiji so bili najpogostejši neželeni učinki hematološka

toksičnost: nevtropenija pri 71 % bolnikov (64 % je bila stopnje 3-4), anemija pri 52 % (37 % stopnje 3-4) in trombocitopenija pri 40 % (21 % stopnje 3-4). Večina citopenij je samoomejujočih. Pri simptomatskih ali hudih citopenijah zdravljenje vključuje predvsem transfuzije krvnih pripravkov. Pri bolnikih, ki se ne odzivajo na transfuzijo trombocitov, se lahko razmisli o zdravljenju z romiplostimom ali eltrombopagom. O dajanju dejavnika za stimulacijo kostnega mozga med nevtropenijo so mnenja deljena. Čeprav lahko skrajša trajanje nevtropenije in zmanjša tveganje za okužbo, obstaja bojazen, da bi lahko povečal tveganje za CRS.

Druge toksičnosti

BsAbs usmerjena proti GPRC5D lahko povzročijo neželene učinke v tkivih, ki izražajo ta protein, zlasti tistih, ki vsebujejo keratin, kot sta koža in nohti (70 % bolnikov). Simptomi so lahko izpuščaj, zlasti luščenje kože na rokah in nogah, spremembe nohtov, spremenjen okus (disgeuzija) pri 60 % bolnikov, zmanjšan apetit in suha usta. Za obvladovanje teh neželenih učinkov se uporabljajo lokalni vlažilci, losjon z amonijevim laktatom in steroidi. Prav tako je pomembno vzdrževanje ustrezne hidracije.

Literatura:

1. Markouli M, Ullah F, Unlu S, Omar N, Lopetegui-lia N, Duco M, et al. Toxicity Profile of Chimeric Antigen Receptor T-Cell and Bispecific Antibody Therapies in Multiple Myeloma : Pathogenesis, Prevention and Management. 2023;6330–52.
2. Khanam R, Faiman B, Batool S, Najmuddin MM, Usman R, Kuriakose K, et al. Management of Adverse Reactions for BCMA-Directed Therapy in Relapsed Multiple Myeloma : A Focused Review. 2023;
3. Conroy R. Managing Toxicity Following Bispecific Therapy in R / R Multiple Myeloma Managing Skin and Nail Changes Associated with Talquetamab Therapy. 2023;1–7.
4. Roma G. New BiTE Agents Provide Effective Options for Treatment of Relapsed / Refractory Multiple Myeloma. 2023;1–8.

5. Journal BC. Infectious complications of bispecific antibody therapy in patients with multiple myeloma. 2023;(December 2022):11–4.
6. Cho S, Yeh T, Anderson KC, Tai Y. Bispecific antibodies in multiple myeloma treatment : A journey in progress. 2022;(October):1–15.
7. Sammartano V, Franceschini M, Fredducci S, Caroni F, Ciofini S, Pacelli P, et al. Anti-BCMA novel therapies for multiple myeloma. 2023;169–81.

Mieloproliferativne bolezni (ZHS, HLZ)

Preverjanje odstopanj v rezultatih hematološkega analizatorja

Tadej Furlan

Specializirani hematološki laboratorij, Klinični oddelek za hematologijo, UKC Ljubljana

tadej.furlan@kclj.si

Overjanje analizatorja je proces, ki se izvaja za potrditev njegove zanesljivosti, natančnosti in skladnosti s standardi. Glavni cilj verifikacije je preveriti, ali je analizator sposoben pravilno identificirati, ločiti in kvantificirati različne vrste krvnih celic ter pravilno izračunati hematološke parametre, kot so MCV, MCH in MCHC.

To običajno vključuje redno kalibracijo analizatorja, izvajanje kontrolnih analiz z znanimi vzorci in primerjavo rezultatov z referenčnimi vrednostmi. Ta postopek je pomemben za zagotovitev kakovosti in natančnosti laboratorijskih rezultatov. Dodatno je potrebno izvesti tudi izobraževanje osebja za pravilno uporabo analizatorja.

Hematološke analizatorje uporabljamo za štetje levkocitov, trombocitov in eritrocitov ter za določanje koncentracije hemoglobina in za diferencialno krvno sliko.

Novejši hematološki analizatorji podajajo 6-delno avtomatizirano diferencialno krvno sliko, ki je sestavljena iz absolutnega in relativnega deleža limfocitov, monocitov, nevtrofilcev, eozinofilcev, bazofilcev ter nezrelih granulocitov.

Princip merjenja temelji na dveh metodah:

- Pretočna citometrija s semikonduktivnim laserjem. Z njo pridobimo informacijo o velikosti, zgradbi ter vsebnosti nukleinskih kislin celice.
- Metoda DC/RF. Metoda DC/RF zazna velikost celic ter njeno notranjo zgradbo. Ta metoda pa je tudi zelo učinkovita pri ločevanju nezrelih celic.

Poleg števila in diferenciranja zrelih levkocitov nam analizator poda tudi podatek o številu nezrelih granulocitov in njihov delež. Analizator zazna tudi abnormalne celice. Nanje nas opozori z opozorilom (flag). Sem sodijo:

- blasti
- reaktivni limfociti
- atipični limfociti
- nezreli granulociti

Pri vsakem novem analizatorju je potrebno opraviti celovito ovrednotenje ob vpeljavi v rutinsko delo v skladu s smernicami ICSH 2014. Vpeljava hematološkega analizatorja običajno vključuje več korakov, med katerimi so:

- specifičnost, občutljivost, pozitivno in negativno napovedno vrednost ter celokupno učinkovitost opozoril analizatorja na agregate trombocitov, nezrele granulocite, reaktivne limfocite, atipične limfocite in blaste,
- območje linearnosti za levkocite, eritrocite, hemoglobin in trombocite,
- »carry-over« za levkocite, eritrocite, hemoglobin in trombocite,
- stabilnost ključnih merjenih parametrov pri hranjenju vzorca na sobni temperaturi in v hladilniku (4°C) po 4-ih, 8-ih, 24-ih, 48-ih in 72-ih urah. Stabilnost je potrebno določati za časovno obdobje, v katerem laboratorij še izdaja izvide.

V primeru uporabe analizatorjev za avtomatizirano izdelavo in barvanje krvnega razmaza, je potrebno overiti tudi slednje. Preveriti je potrebno kakovost razmazov in njihovega barvanja ter narediti primerljivost rezultatov štetja z ročno pripravo.

Nekateri hematološki analizatorji uporabljajo tudi aplikacije, katere so nam v pomoč pri izdaji rezultatov ob pojavu interferenc. Morebitne napake pri analizi eritrocitne vrste vodijo v napačne izračune eritrocitnih indeksov, npr. MCHC. Zvišan MCHC je fiziološko redek pojav, zato je take vzorce potrebno natančno pregledati in ugotoviti, ali je MCHC resnično zvišan zaradi patološkega stanja eritrocitne vrste, ali pa je lažno zvišan zaradi optičnih interferenc ali aglutinacije eritrocitov. Zaradi tega se lahko uporablja nov algoritem, pri katerem se s pomočjo optičnih in impedančnih meritve eritrocitov ter meritve hemoglobina in izračuna hemoglobina iz optične meritve v retikulocitnem kanalu ugotavlja vzrok zvišanega MCHC (lažno zvišan zaradi hemolize, ikteričnega, lipemičnega vzorca, ali resnično zvišan MCHC zaradi patologije eritrocitne vrste). V primeru uporabe takih aplikacij je pred začetkom uporabe nujno potrebna verifikacija.

Ob zaključku verifikacije je potrebno določiti tudi redne vzdrževalne postopke, vključno s čiščenjem, servisiranjem in rednim preverjanjem delovanja analizatorja. Vsak od teh korakov je ključen za uspešno vpeljavo hematološkega analizatorja v laboratorijsko okolje.

Zaključek

Pred vsakim začetkom uporabe novega hematološkega analizatorja je vedno potrebno testirati vse ključne parametre, ki so za določen laboratorij pomembni. Šele po zaključku testiranja se ga lahko vpelje v rutino. To je ključno za zagotavljanje natančnih in zanesljivih laboratorijskih rezultatov, kar je pomembno za pravilno diagnozo in zdravljenje pacientov.

Literatura

1. [27.03.2024]. Na voljo od: <https://www.sysmex-europe.com/products/products-detail/xn-1000.html>

2. Briggs C., Culp N., et al. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2014, 36, 613–627. DOI: 10.1111/ijlh.12201

Novosti pri zdravljenju primarne mielofibroze

Mihela Šajn, Saša Anžej Doma

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

Mihela.sajn@kclj.si

Primarna mielofibroza (PMF) je mieloproliferativna neoplazma, za katero je značilna klonaska proliferacija, ki jo pogosto, vendar ne vedno, spremljajo mutacije *JAK2*, *CALR* ali *MPL*. Dodatne značilnosti so retikulinska/kolagenska fibroza kostnega mozga, nenormalno izražanje vnetnih citokinov, anemija, hepatosplenomegalija, ekstramedularna hematopoeza, konstitucionalni (B) simptomi, kaheksija, tveganje za napredovanje v akutno levkemijo in skrajšano preživetje.

O načinu zdravljenja se odločamo individualno na podlagi sodobnih prognostičnih točkovnikov, ki poleg kliničnih dejavnikov tveganja (starost, B simptomi, vrednost hemoglobina, število levkocitov, trombocitov, delež blastov) upoštevajo tudi citogenetske in molekularno-genetske najdbe (DIPSS-plus, MIPSS70, MIPSS70+v2), GIPSS točkovnik napoveduje samo iz molekularno-genetskih in citogenetskih najdb. Pomembno je torej, da pred odločitvijo o zdravljenju opravimo usmerjene preiskave, vključno s sekvencioniranjem naslednje generacije (NGS).

Neugodne molekularno-genetske spremembe pri PMF so *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *U2AF1Q157* (nekaj razlik je glede na uporabljeni točkovnik). Visoko tvegan kariotip pri PMF vključuje enojne/večkratne nenormalnosti -7, inv (3)/3q21, i(17q), 12p-/12p11.2 ali 11q-/11q23, enojne/večkratne avtosomne trisomije, razen +9 in +8. Ločimo še neugoden kariotip, pri čemer pa se sem uvrščajo različne najdbe glede na to, ali vzamemo DIPSS-plus (kompleksen kariotip ali nenormalnosti +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p- ali 11q23 preureditve) ali GIPSS/MIPSSv2 (normalen kariotip, prisotnost izključno ene nenormalnosti: 20q-, 13q-, +9, translokacija/podvajanje kromosoma 1, -Y ali nenormalnost spolnega kromosoma, ki ni -Y).

Zaenkrat je edini način zdravljenja, ki vodi v podaljšano preživetje ali potencialno ozdravitev PMF alogenska presaditev krvotvornih matičnih celic (aloPKMC). Povezana pa je z vsaj 30 % smrtnostjo zaradi presaditve same ali boleznj presadka proti gostitelju. Zato prihaja v poštev pri bolnikih z zelo visokim in visokim tveganjem (ocenjeno 10-letno preživetje 0–13 %), pa tudi pri skrbno izbranih bolnikih z boleznijo srednjega tveganja (ocenjeno 10-letno preživetje 30 %). Za bolezen z nizkim in zelo nizkim tveganjem glede na MIPSSv2 (ocenjeno 10-letno preživetje 56 %–92 %), je priporočeno samo opazovanje. Najbolj aktualna med zdravili za zdravljenje PMF so trenutno JAK inhibitorji (JAKi), ki delujejo predvsem kot protivnetna zdravila - izboljšajo splošne simptome in velikost vranice, a so brez večjega vpliva na napredovanje bolezni.

V nadaljevanju prispevka se osredotočava na nova zdravila, ki so že na voljo, in sicer nove JAKi, zaviralec BCL2 /BCL-X_L navitoklaks, ki deluje sinergistično z JAKi in ga lahko pridobimo za sočutno rabo, ter pegilirano obliko interferona- α , ki je ena redkih molekul, ki cilja na mutirani klon.

JAK inhibitorji

Ruksolitinib je bil prvi JAKi, odobren za zdravljenje bolnikov z PMF srednjega in visokega tveganja. Postal je referenca za zdravljenje PMF z učinkom na zmanjšanje B simptomov, splenomegalije in izboljšanjem kakovosti življenja v približno 50 % primerov. Glavni toksični učinki zdravila so anemija, trombocitopenija in okužbe. Kljub začetnemu odzivu približno 50 % bolnikov prekine zdravljenje z ruksolitinibom v 3 letih, predvsem zaradi pomanjkanja ali izgube odziva, citopenij ali napredovanja v blastno fazo. Na splošno ima pri večini bolnikov ruksolitinib minimalen vpliv na klonsko proliferacijo in posledično nima pomembnega vpliva na napredovanje bolezni. Mutacije *ASXL1*, *EZH2* in *RAS*, ki so lahko pridobljene med zdravljenjem, napovedujejo slab odziv na ruksolitinib.

Fedratinib, zaviralec *JAK2/FLT3*, je drugi odobreni zaviralec JAK pri PMF. V primerjavi z ruksolitinibom ima boljši odziv na splenomegalijo, a večjo nehematološko, predvsem gastrointestinalno toksičnost. Indiciran je tako v prvi kot v drugi liniji, če bolniki ne prenašajo

ruksolitiniba ali so nanj odporni. Med zdravljenjem lahko pride do razvoja Wernickejeve encefalopatije zaradi pomanjkanja tiamina kot posledice gastrointestinalne toksičnosti in kontroverznega zaviranja transporterja tiamina-2, zato je priporočljivo spremljati vrednosti tiamina ter ga po potrebi nadomeščati.

Pakritinib je zaviralec *JAK2/FLT3*, zavira pa tudi *IRAK1*, ki uravnava sintezo številnih protivnetnih citokinov. Zaenkrat še ni jasnih dokazov, da pakritinib zavira razvoj fibroze kostnega mozga. Glede na klinične podatke je najboljša izbira pri bolnikih z izrazito trombocitopenijo in/ali anemijo, saj vpliva tudi na eritropoezo. Aktivira namreč aktivinski receptor tipa 1 (*ACVR1/ALK2*), ki uravnava jetrno sintezo hepcidina. V Evropi še ni odobren. V ZDA je odobren za zdravljenje bolnikov s številom trombocitov $<50 \times 10^9/L$. Glavni specifični neželeni učinek je gastrointestinalna toksičnost, povečano pa je tudi tveganje krvavitev in srčnih zapletov.

Momelotinib je nedavno odobren zaviralec *JAK1/2* za PMF v Evropi, ki podobno kot pakritinib preko regulacije hepcidina izboljšuje anemijo. Nakazuje se možnost njegove uporabe v nižjih odmerkih za zdravljenje transfuzijsko odvisnih anemičnih bolnikov s PMF, ki sicer nimajo simptomatske splenomegalije ali B simptomov. Najpomembnejši neželeni učinki so trombocitopenija, gastrointestinalna toksičnost, glavobol, periferna senzorična nevropatija in učinek prvega odmerka (omotica, hipotenzija ali zardevanje).

V kliničnih preskušanjih imata momelotinib in pakritinib podobne učinke kot ruksolitinib na splošne simptome in splenomegalijo, vendar lahko popravita anemijo in posledično pri bolnikih zmanjšata potrebo po transfuziji eritrocitov. Zdi se, da je pakritinib varna možnost za bolnike s PMF s hudo trombocitopenijo. To mora potrditi randomizirana študija faze III (PACIFICA), ki poteka. Nobeden od JAKi ne kaže selektivne inhibicije onkogene aktivacije *JAK2*, zato ne vodi do molekularne remisije, medtem ko močna inhibicija *JAK2* povzroči globoko citopenijo. Odpornost na zdravljenje ni povezana z mutacijami *JAK2*. Kadar med terapijo pride do mutacij v poti *RAS*, so lahko prisotne v klonu *JAK2V617F* ali celicah *JAK2WT*. Zato obstaja potreba po razvoju selektivnih inhibitorjev *JAK2V617F* in molekul, ki ciljajo na mutacije v *CALR* in *MPL*.

BCL2 zaviralci

Navitoklaks je zaviralec proteinov BCL2 družine in deluje sinergistično z JAK2i. Poleg tega pri bolnikih, pri katerih zdravljenje z ruksolitinitibom ni več zadostno, premosti odpornost v celičnih linijah JAK2V617F. Klinična preskušanja 2. faze s to kombinacijo so bila obetavna, pri bolnikih se je pomembno zmanjšal volumen vranice, zmanjšanjala se je fibroza. Poročajo, da sta pri nekaterih bolnikih fibroza ter alelna breme JAK2V617F/CALR celo izginila. Klinična preskušanja 3. faze potekajo. Ta kombinacija se zdi ena najučinkovitejših.

Interferon- α

Mehanizem delovanja IFN- α na klonsko motnjo ni povsem jasen. Trenutno je njegova uporaba pri PMF omejena zaradi njegove toksičnosti in slabega učinka na splenomegalijo, vendar rezultati kažejo, da je lahko pegilirana oblika učinkovita, tudi pri PMF z visokim tveganjem. Zdravljenje lahko zmanjša alelna breme JAK2V617F in zdi se, da pri bolnikih, ki se odzovejo, pomembno vpliva na preživetje bolnikov. Kljub temu pa je bilo v študijah zdravljenje prekinjeno pri skoraj 75 % bolnikov zaradi napredovanja bolezni ali neprenašanja zdravila. V kliničnih študijah preizkušajo kombinacijo IFN- α z ruksolitinitibom; slednji lahko zaradi svojega močnega protivnetnega učinka poveča toleranco za IFN α , kar omogoči uporabo nižjega odmerka IFN α ter prispeva k zmanjšanju toksičnih učinkov zdravljenja, vpliva pa na zmanjšanje alelnega bremena JAK2V617F VAF in fibroze.

Boljše razumevanje genetike PMF, biologije njenih levkemičnih matičnih celic, mehanizmov fibroze in citopenij ter vloge vnetnih citokinov vodi do novih pristopov z razvojem številnih terapevtskih učinkovin v fazi začetnih kliničnih preizkušanj. Ti ciljajo na epigenetsko regulacijo, telomeraze, apoptozo, celični cikel, citokine in signalizacijo in imajo različne cilje: zagotoviti alternativo zaviranja JAK, korekcijo citopenij in zaviranje razvoja fibroze. Glavni cilj je najti nove modifikatorje bolezni, ki bodo temeljito zmanjšali možnost napredovanja bolezni brez večje toksičnosti. Za najbolj enostavne in obetajoče prihodnje pristope se šteje selektivno zaviranje

JAK2V617F in tarčno delovanje na mutaciji *MPL* in *CALR*. Pričakujemo lahko, da se bo terapija PMF v prihodnjih letih bistveno izboljšala.

Literatura:

1. Tefferi A; Primary myelofibrosis: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2023 May;98(5):801-821. [https://doi: 10.1002/ajh.26857](https://doi:10.1002/ajh.26857). PMID: 3668051g1.
2. Vainchenker W, Yahmi N, Havelange V, Marty C, Plo I, Constantinescu SN; Recent advances in therapies for primary myelofibrosis. *Fac Rev.* 2023 Sep 26;12:23. [https://doi: 10.12703/r/12-23](https://doi:10.12703/r/12-23). PMID: 37771602.

Kronična nevtrofilna levkemija, atipična kronična mieloična levkemija ali kaj drugega?

Mihael Kosi, Biljana Todorova

Oddelek za hematologijo in onkologijo, Splošna bolnišnica Celje

Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana

mihael.kosi@sb-celje.si

Uvod

Levkocitoza z zveznim premikom je ena najbolj prepoznavnih sprememb krvne slike v hematologiji. Najpogosteje jo najdemo pri kronični mieloični levkemiji (KML), ker pa vzročna povezava ni stoddstotna, diagnozo KML potrjujemo s testom na prisotnost fuzijskega gena BCR-ABL. Ob negativnem izvidu se hitro znajdemo med diagnozami, ki jih v hematološki literaturi le bežno omenjajo, še najpogosteje so naštetje zgolj med diferencialnimi diagnozami KML. Za potrditev teh redkejših bolezni se poslužujemo številnih kriterijev, ki razširijo nabor diagnostičnih preiskav. Pri tem nam v zadnjih letih pomaga sekvenciranje naslednje generacije (NGS), ki občasno poda celo več odgovorov, kot jih iščemo. V prispevku predstavljamo pacienta z atipično KML, pri katerem smo z NGS našli prirojeno GATA2 pomanjkljivost.

65-letni gospod je bil sprejet na KOH zaradi suma na KML z znaki diseminirane intravaskularne koagulopatije (DIC). Opisoval je nekaj tednov trajajočo splošno slabo počutje, hitro utrudljivost in spontane epistakse. Ob sprejemu je krvna slika pokazala bicitopenijo, Hemoglobin 44 in trombociti 37. Levkociti so ob tem bili povišani (105), z zveznim premikom v levo; blasti 3%, promielociti 2%, mielociti 16%, metamielociti 7%, paličasti in segmentirani nevtrofilci so predstavljali 12% in 52%. Testi hemostaze so pokazali nemerljivo visok d-dimer, APTČ je bil blago podaljšan, INR še normalen. Vnetni parametri so bili nizki. Ob pregledu sta izstopala blago povečana jetra in vranica – 2 cm pod rebrnim lokom.

Opravili smo diagnostiko kostnega mozga v smeri KML in uvedli terapijo s hidroksiureo (HU). Preiskava na BCR-ABL je bila negativna, s čimer smo KML izključili. Diferencialno diagnostično so se ponujale: levkemoidna reakcija ob neodkritem malignem procesu, atipična KML, kronična nevtrofilna levkemija (KNL). Podobne težave in spremembe krvne slike bi lahko povzročale tudi kronična mielomonocitna levkemija (KMML) ali kronična eozinofilna levkemija (KEL), le te so sicer ob nizkih vrednostih monocitov in eozinofilcev v periferni krvi manj verjetne.

Po uvedbi HU so se pojavili znaki dekompenzacije DICa - obsežne epistakse in tipične spremembe testov hemostaze. Po izboljšanju krvne slike – ob terapiji z HU, in podporni terapiji je DIC izzvenel.

V sklopu iskanja povzročitelja levkemoidne reakcije smo opravili presejalne teste za maligna obolenja: tumorski markerji so z izjemo CEA in tiroglobulina bili negativni. UZ trebuha, elektroforeza proteinov, CT abdomna bistvenih odstopanj niso pokazali. CT prsnih organov je pokazal drobne, neostro omejene mikronodule gostote mlečnega stekla v vseh režnjih, nejasne etiologije. Povečanih bezgavk preiskava ni pokazala. Opravili smo še PET-CT, ki razen povišane aktivnosti v kostnem mozgu znakov malignega dogajanja ni pokazal. In se posvetovali s tirologom, ki se za biopsijo ščitnice ob DICu in nizki verjetnosti karcinoma ščitnice ni odločil.

Biopsija kostnega mozga je po samem izgledu najbolj spominjala na KML. V luči negativnega BCR-ABL, bi lahko bile spremembe združljive z KMML ali atipično KML. Citološki pregled punkcije je pokazal razrast granulopoeze z premikom v levo in znaki dispoeze.

Naknadno smo prejeli izvid NGS, ki je pokazal mutacije genov GATA2, ASXL1 in SRSF2. CSF3R mutacije nismo dokazali, posledično je verjetnost za KNL močno upadla. Malignega procesa, ki bi povzročal levkemoidno reakcijo nismo našli. S preiskavami smo zadostili vse kriterije za atipično KML. Uvedli smo zdravljenje z Azacitidinom, in nadaljevali z HU do normalizacije krvne slike ter podporno transfuzijsko zdravljenje. Z NGS smo tudi odkrili najverjetnejši sprožilec hematološkega obolenja. Glede na VAF mutacije v GATA2 genu (50%) gre namreč za germinalno mutacijo in s tem za sindrom GATA2 deficience.

GATA2 deficienca je bila prvič v literaturi opisana leta 2011. Gre za avtosomno dominantno dedovan sindrom imunske pomanjkljivosti, z nagnjenjem k razvoju hematoloških novotvorb. Sam gen je ključen pri proliferaciji in samoobnovi krvotvornih matičnih celic in limfatični angiogenezi. Posledice mutacije zaznamo v pomankanju NK celic, limfocitov B, monocitov in dendritičnih celic, večino hipocelularnem kostnem mozgu ter pojavu limfedema. Pogosteje se pojavljajo okužbe z netuberkuloznimi mikobakterijami, hujše in podaljšane okužbe z HPV, herpes virusi in EBV. Dolgoročno imajo nagnjenje k razvoju hematoloških neoplazem, predvsem MDS, AML in kroničnim levkemijam. Ob GATA2 najdemo pri teh pacientih pogosteje še ASXL1 (20%) in STAG2 (25%) mutaciji, ki sta lahko prisotni že pred razvojem hematološke neoplazme. GATA2 je tudi prisoten pri 7% pediatričnih MDS, 15-33% MDS/AML z družinsko pojavnostjo. Za mutacijo so značilne tudi pljučna prizadetost – pulmonalna alveolarna proteinoza (PAP) in posledično pljučna hipertenzija. Pogosteje so prisotne številne bradavice po koži – posledice HPV ter ploščatocelični karcinom kože, posledica ponavljajočih se okužb. Po še neznanih mehanizmih povzročajo izgube sluha, pogostejše splave, hipotirozo. Penetranca mutacije je nepopolna, tako je izražanje nepredvidljivo. Pri 20-letni starosti je simptomatskih 20% nosilcev mutacije, pri 60-letnih je simptomatskih že 95%.

Zdravljenje GATA2 deficiencie zaenkrat nimamo. Svetovano je cepljenje za HPV, profilaktična zaščita z azitromicinom ter nižji prag pristopa za priskave okvare tarčnih organov. Zaenkrat je ozdravitev možna le z presaditvijo kostnega mozga.

Glede na skupek simptomov in najdb z zastavljenimi preiskavami se pri gospodu ponuja tudi diagnoza MonoMAC sindroma podskupina »GATA2 deficiencie« sindroma, ki ga odlikujeta monocitopenija (mono) in pogoste okužbe z micobacterium avium complex (MAC). Tudi pri monoMAC sindromu ob GATA 2 mutaciji najdemo hematološke neoplazme, z mutacijo ASXL1, PAP. Spremembe najdene na CT pljuč bi lahko predstavljale PAP ali posledico okužb z mikobakterijskimi bakterijami, vendar pa se za nadaljnjo invazivno diagnostiko nismo odločili, saj bistveno ne bi spreminjala zastavljene terapije.

Gospod je začel zdravljenje atipične KML z azacitidinom, ob katerem smo beležili izboljšanje krvne slike. Tekom zdravljenja je prišlo še do dveh zagonov DICa, vendar je ta ob simptomatski terapiji izzvenel brez zapletov. Svojce smo opozorili na možnost dedovanja GATA2 mutacije, vendar pa se zaenkrat za testiranje niso odločili.

Zaključek:

Z lažjo dostopnostjo NGSa smo v preteklih letih pridobili močno orodje pri prepoznavanju redkih hematoloških bolezni. Bolezen lahko na osnovi mutacij, ki jih najdemo, boljše opredelimo, v nekaterih primerih lahko tudi prilagodimo zdravljenje in sledenje bolezni, tako pri pacientu samem, v kolikor pa gre za dedno mutacijo pa tudi pri njegovih svojcih.

Literatura:

1. Santiago, M.; Liquori, A.; Such, E.; Zúñiga, Á.; Cervera, J. The Clinical Spectrum, Diagnosis, and Management of GATA2 Deficiency. *Cancers* **2023**, *15*, 1590. <https://doi.org/10.3390/cancers15051590>
2. Hsu AP, McReynolds LJ, Holland SM. GATA2 deficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2015 Feb;15(1):104-9. doi: 10.1097/ACI.0000000000000126. PMID: 25397911; PMCID: PMC4342850.
3. Calvo, K. R.; Hickstein, D. D.; The spectrum of GATA2 deficiency syndrome; *Blood* 2023, *13*, 1524-1532
4. Jason Gotlib; How I treat atypical chronic myeloid leukemia. *Blood* 2017; *129* (7): 838–845. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-693630>
5. Mir, M. A.; Kochuparambil, S. T.; Abraham, R. S.; Rodriguez, V.; Howard, M.; Hsu, A. P.; Jackson, A. E.; Holland, S. M.; Patnaik, M. M.; Spectrum of myeloid neoplasms and immune deficiency associated with germline GATA2 mutations; *Cancer Medicine* 2015, *4*(4): 490–499: doi: <https://doi.org/10.1002/cam4.384>

Pomen nestandardnih genetskih različic pri mieloproliferativnih boleznih

Sandra Šučurović

Klinični oddelek za hematologijo, Specializirani hematološki laboratorij, UKC Ljubljana

sandra.sucurovic@kclj.si

Mieloproliferativne novotvorbe (MPN) so pridobljene klonske spremembe krvotvornih matičnih celic, za katere je značilna nekontrolirana proliferacija, ki vodi do kopičenja zrelih krvnih celic. Po klasifikaciji hematoloških bolezni Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) iz leta 2022 se MPN delijo na kronično mieloično levkemijo (KML), pravo policitemijo (PV), esencialno trombocitemijo (ET), primarno mielofibrozo (PMF), kronično nevtrofilno levkemijo, kronično eozinofilno levkemijo, juvenilno mielomonocitno levkemijo in neopredeljeno mieloproliferativno neoplazmo (1). Omenjene bolezni lahko glede na prisotnost ali odsotnost fuzijskega gena *BCR::ABL1* oziroma Philadelphia kromosoma (Ph) razvrstimo v dve osnovni skupini. MPN Ph+ vključuje KML, za katero je značilna prisotnost fuzijskega gena *BCR::ABL1*. Skupina MPN Ph-, v kateri je fuzijski gen *BCR::ABL1* izključen, vključuje PV, ET, PMF, kronično nevtrofilno levkemijo, kronično eozinofilno levkemijo, juvenilno mielomonocitno levkemijo in neopredeljene mieloproliferativne neoplazme. Najpogostejši vzrok PV, ET ali PMF je prisotnost različic v genih *JAK2*, *CALR* in *MPL*. Ti geni aktivirajo celično signalizacijo preko poti JAK/STAT, ki vodi do nekontrolirane celične proliferacije.

Različica p.V617F v genu *JAK2* je prisotna pri približno 98 % bolnikov s PV. Različice v eksonu 12 gena *JAK2* so prisotne v skoraj vseh preostalih primerih PV. Ista različica p.V617F je prisotna tudi pri približno 55 % bolnikov z ET in približno 60 % bolnikov z PMF. Različice v genu *CALR* so prisotne od 25% - 30% pri ET in 20 % - 30 % pri PMF. Različice v genu *MPL* so prisotne od 5 % - 7 % pri ET in 7 % - 10 % pri PMF (2). "Trojno negativni" bolniki predstavljajo majhen odstotek primerov ET in PMF in pri njih je potrebna razširjena analiza genov, ki sodelujejo pri razvoju MPN (3).

Medtem ko se različice v genih *JAK2*, *CALR* in *MPL* štejejo za gonilne dogodke, so različice v drugih genih – zlasti *TET2*, *ASXL1* in *DNMT3A* – odkrite pri več kot polovici bolnikov z MPN. Različice, v

genih, ki so regulatorji izrezovanja intronov in spajanja eksonov (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*) in genih, ki so regulatorji strukture kromatina, epigenetskih funkcij in celične signalizacije (npr. *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *CBL*, *KRAS*, *NRAS*, *STAG2*, *TP53*) so manj pogoste. Te dodatne različice so pogostejše pri PMF v primerjavi s PV in ET, za nekatere pa je znano, da korelirajo s slabšim prognostičnim tveganjem (npr. različice v genih *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *SRSF2*, *U2AF1* in *ASXL1* pri PMF) (3).

Literatura:

1. 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.
2. Luque Paz D, Kralovics R, Skoda. RCGenetic basis and molecular profiling in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2023 Apr 20;141(16):1909-1921.
3. Greenfield G, McMullin MF i Mills K. Molecular pathogenesis of the myeloproliferative neoplasms. *J Hematol Oncol*. 2021 Jun 30;14(1):103.

Vpliv predanalitskih odstopanj na izvide hemostaze

Martina Fink

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

martina.finkk@kclj.si

Dejavnike, ki vplivajo na rezultate laboratorijskih preiskav, je v skladu z dobro laboratorijsko prakso potrebno nadzorovati. Preiskovanje vzorcev v medicinskem laboratoriju lahko razdelimo v tri faze: predanalitsko, analitsko in poanalitsko. Največ napak se zgodi v predanalitskem delu, kjer se pojavi kar 50 - 75 % vseh laboratorijskih napak. Preiskovanje neustreznih vzorcev vodi do podajanja nezanesljivih ali pa celo napačnih laboratorijskih rezultatov, kar pa lahko povzroči neustrezne ali celo napačne klinične odločitve. Zato je zelo pomembno poznavanje in prepoznavanje vzrokov predanalitskih napak in, da se omeji njihova pojavnost.

V predanalitski del laboratorijskega preiskovanja uvrščamo izbor in naročilo preiskav, odvzem vzorcev, njihov prenos v laboratorij, ter pripravo in shranjevanje vzorcev pred samo analizo. Večina predanalitskih postopkov se zgodi izven medicinskega laboratorija, zato morajo biti s predanalitskimi vplivi na rezultate laboratorijskih preiskav seznanjeni tako bolniki sami, zdravniki, ki naročajo preiskave, osebje, ki je vpleteno v odvzem vzorcev, osebje, ki sodeluje pri prenosu vzorcev v laboratorij in tudi laboratorijski delavci, ki vzorce sprejmejo v laboratoriju in jih pripravijo za analizo oziroma jih shranijo pred samo analizo.

Motnje v hemostazi povzročajo krvavitve ali pa tromboze. Motnje v hemostazi so lahko tudi posledica drugih bolezni ali pa prejetja zdravil. Laboratorijske preiskave hemostaze dajejo pomembne informacije za diagnozo, prognozo in spremljanje zdravljenja. Vzorci za preiskave

hemostaze so še posebej občutljivi na vplive predanalitskih dejavnikov, ker že sam odvzem vzorca povzroči aktivacijo hemostaze zaradi poškodbe žilnega endotelija. Sistem hemostaze je izredno kompleksen na celični in biokemijski ravni, proteini, ki so vpleteni v hemostazo so nestabilni, številne beljakovine, ki so vpletene v hemostazo so sestavni del akutnega odgovora,...kar vse povzroča visoko občutljivost hemostaze na predanalitske dejavnike. Ker pa so številne preiskave v medicinskih laboratorijih avtomatizirane in zato tudi standardizirane, so zato tudi bolj občutljive na predanalitske dejavnike. Na kvaliteto vzorcev in s tem posledično na kvalitete rezultatov preiskav še zlasti vplivajo: način odvzema, debelina igle, hitrost pretoka krvi (hitrost polnjenja epruvete), razmerje kri - citrat, uživanje zdravil, ter fiziološko oziroma patofiziološko stanje preiskovancev.

Hemostaza je izredno občutljiva na vplive predanalitičnih dejavnikov, kajti že med odvzemanjem vzorca poškodujemo žilni endotelij, kar sproži lokalno aktivacijo trombocitov. Z mešanjem in homogenizacijo vzorcev lahko povzročimo aktivacijo hemostaze. Ker je priporočeni antikoagulant za teste hemostaze Na-citrat, ki je raztopina, z neustrezno polnitvijo epruvet (premalo napolnjene) povzročimo redčenje vzorcev in s tem nepravilne rezultate. Ostali antikoagulanti niso primerni za izvajanje preiskav na področju hemostaze, in zato odvzem vzorcev v epruvete z drugimi antikoagulanti vodi do zavrnitve vzorcev in s tem neizvedbe preiskav. Na rezultate testov hemostaze močno vplivajo zdravila, uživanje hrane in pijače, ter še številni drugi fiziološki in patofiziološki dejavniki (telesna aktivnost, starost, spol, krvna skupina, nosečnost, kajenje, različne bolezni, uživanje zdravil,...). Nekateri proteini (FVIII, von Willebrandov faktor, fibrinogen,...), ki so vpleteni v hemostazo, so tudi proteini akutne faze, zato se njihova aktivnost ali koncentracija ob stresu ali različnih fizioloških in patofizioloških stanjih lahko povečata. Pomembna predanalitska vpliva na teste hemostaze sta tudi prenos v laboratorij in centrifugiranje, ki naj po priporočilih potekata pri sobni T. Za večino preiskav na področju hemostaze so vzorci je stabilni 4 h (tudi če so shranjevanji na sobni temperaturi).

Če preiskav ne moremo izvesti v priporočenem času, vzorce plazme zamrznemo in jih pred analizo odtalimo z inkubacijo pri 37°C, odtaljenih vzorcev pa ne smemo ponovno zamrzovati. Vzorcev za oceno delovanja primarne hemostaze (zapiralni čas in agregacija trombocitev) ne smemo ne centrifugirati in tudi ne zamrzovati, ker preiskave potekajo v polni krvi. Vzorcev za določitev protrombinskega časa (PČ), aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (APTČ) in trombinskega časa ne smemo zamrzovati in preiskave lahko izvajamo le na svežih vzorcih. Na številne proteine vpletene v hemostazo, vpliva temperatura (nizka temperatura lahko aktivira hemostazo), zato je pomembno, da se vzorce pošilja na sobni temperaturi (18 - 25°C).

Motnje strjevanja krvi so pogosto uravnavajo z zdravili, ki lahko preprečujejo tromboze ali pa krvavitve. Delovanje teh zdravil se tudi spremlja v laboratoriju in da laboratorij lahko poda pravilne rezultate, potrebuje informacije o zdravilih, ki jih bolnik prejema. Informacije o zdravilih so pomembne za pravilno izbiro testnega sistema. Pogosta predanalitska napaka je tudi hemoliza, ki povzroča obarvanost vzorca in tako lahko moti analizo. Hemoliza pa lahko tudi aktivira hemostazo. Težavo predstavljajo tudi iz razpadlih celic sproščene snovi, ki aktivirajo trombocite in strjevanje vzorcev. Močno hemolizirane vzorce zavrnamo. Samo izvedbo preiskave motita tudi lipemija in ikteričnost.

Zaradi vseh naštetih interferenc je zelo pomembno, da se držimo priporočil za odvzem, prenos in pripravo vzorcev za teste hemostaze.

Priporočila za odvzem in transport vzorcev:

- Bolnik naj pred odvzemom 15 - 30 min miruje.
- Odvzem je iz vene in ne na okončini s centralnim venskim kanalom, dializnim pristopom,...

- Vzorce se odvzame v epruveto z Na-citratom (3,2 % (109 mmol /l)) - epruvete imajo svetlo moder zamašek.
- Premer igle za odvzem 19 - 22G
- Čas preveze, naj bo manj kot 1 min.
- Epruvete morajo biti vsaj 90 % napolnjene, ker je antikoagulant citrat raztopina in, če so epruvete nezadostno napolnjene to povzroči razredčitve vzorcev.
- Odvzem za teste hemostaze je takoj za odvzemom za mikrobiološke preiskave.
- Takoj po odvzemu se vzorce premeša z obračanjem epruвет.
- Vzorce se v prisotnosti preiskovanca nedvoumno označi (ime in priimek, datum rojstva, KZZ...).
- Vzorce se v laboratorij pošlje čimprej in ne po cevni pošti.
- Vzorce se pošilja na sobni temperaturi.
- V laboratoriju se vzorce pregleda in čimprej pripravi za analizo ozr. shrani, če se preiskave ne izvedejo takoj.
- Centrifugiranje vzorcev poteka na sobni temperaturi (18 – 25°C), 15 min pri vsaj 1500 g.
- Če preiskav laboratorij ne more izvesti takoj, se plazmo zamrzne na -20 ali -70°C.

Literatura

1. Clinical Laboratory Standard Institute - CLSI H21 A5; Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays, 5th Ed. 2008.

Zdravljenje indolentne sistemske mastocitoze

Gaja Cvejić Vidali, Matevž Škerget

KO za hematologijo, UKC Ljubljana,

gaja.cvejic.vidali@kclj.si

Mastocitoza zajema široko skupino bolezni, ki jih zaznamuje nenadzorovana proliferacija in akumulacija mastocitov. Mastociti, znani tudi kot tkivni bazofilci, izvirajo iz mieloične linije v kostnem mozgu ter dozoriijo v tkivih. Kot del prirojenega imunskega sistema sodelujejo pri sprožitvi vnetnih odzivov. Na membrani mastocitov se nahaja receptor za imunoglobulin E (IgE). Vezava IgE protitelesa na receptor povzroči degranulacijo mastocitov in sproščanje različnih mediatorjev v zunajcelični prostor. To vodi do kemotakse levkocitov, povzroča konstrikcijo gladkih mišic v dihalih ter povečuje prepustnost kapilar. Dodatno mastociti proizvajajo prokoagulantne citokine, levkotriene in faktor aktivacije trombocitov, ki igrajo pomembno vlogo pri procesih tkivnega celjenja in angiogenezi. S tem imajo mastociti ključen vpliv na homeostazo organizma. Razumevanje mehanizmov delovanja mastocitov ter njihovih učinkov na organizem je ključno za razvoj terapevtskih pristopov. Odkrivanje in zdravljenje sistemske mastocitoze lahko bistveno izboljša kakovost življenja posameznikov.

Pri bolnikih z indolentno obliko mastocitoze in mastocitozo kostnega mozga zdravljenje temelji na preprečevanju aktivacije mastocitov in s tem zmanjšanju simptomov bolezni. Zaradi sproščanja mediatorjev iz mastocitov imajo bolniki sistemske simptome: bolečine v trebuhu, napenjanje, dispepsijo, diarejo, rdečico obraza, glavobol, hipotenzijo in anafilaksijo. Najbolj jih ogroža anafilaksija, zato morajo bolniki ob sebi zmeraj imeti dva odmerka samoinjektora adrenalina. Seznanjeni morajo biti s potencialnimi sprožitelji sproščanja citokinov: izpostavljenost vlažnemu, vročemu ali hladnemu okolju, čustveni stres, intenzivna fizična vadba, uživanje alkohola in pekoče hrane, okužbe in povišana telesna temperatura ter anestezija in operativni postopki. Zdravila, ki

lahko sprožijo aktivacijo mastocitov, so aspirin in NSAR, opioidi, antibiotiki, zlasti vankomicin in mišični relaksanti med anestezijo. Pred operativnimi postopki morajo bolniki prejeti ustrezno premedikacijo z glukokortikoidi, antihistaminikom in antagonistom levkotrienskih receptorjev.

Simptomatsko zdravljenje temelji na uporabi H1 antihistaminikov, zaviralcev protonske črpalke in antagonistov levkotrienskih receptorjev. Peroralni H1 antihistaminiki preprečujejo rdečico obraza in srbečico. Izbiramo med cetirizinom 10 - 40 mg dnevno, feksofenadinom 180 – 360 mg dnevno, loratadinom 10 – 40 mg dnevno ali desloratadinom 5 mg dnevno. Za boljšo kontrolo simptomov smernice svetujejo kombinacijo H1 antihistaminikov in med epizodami prebijajočih simptomov še dodatek difenhidramina 25 – 50 mg do 4-krat dnevno. Pri bolnikih z gastrointestinalnimi težavami uporabljamo zaviralce protonske črpalke. Iz varnostnih razlogov H2 antihistaminikov ne uporabljamo več. Pri nezadostnem odzivu lahko poskusimo zdravljenje z antagonistom levkotrienskih receptorjev npr. montelukast 10 mg dnevno.

Bolniki s sistemsko mastocitozo, še posebej tisti z mastocitozo kostnega mozga, imajo večjo pojavnost osteoporoze, glede na podatke iz literature med 8 do 40 %. Najpogosteje prizadene hrbtenico. Bolnikom svetujemo merjenje kostne gostote na tri leta. Za zdravljenje osteoporoze uporabljamo antiresorptivno zdravljenje z bisfosfonati. Pri bolnikih s kontraindikacijo za zdravljenje z bisfosfonati, lahko predpišemo denosumab. V manjši raziskavi je ob zdravljenju z denosumabom prišlo do sočasnega znižanja ravni triptaze, kar nakazuje možnost učinka na samo bolezen in zmanjšano breme mastocitov.

Pri bolnikih s ponavljajočimi življenje ogrožajočimi anafilaktičnimi reakcijami imamo največ podatkov o zdravljenju z omalizumabom. To lahko izboljša simptome in preprečuje in pojav anafilaktičnega šoka, vendar je manj učinkovito pri ublažitvi gastrointestinalnih, mišično-skeletnih in nevropsihiatričnih simptomov. Podatki o učinkovitosti izhajajo iz 2 randomiziranih ter več retrospektivnih kohortnih raziskav.

Na simptome bolezni lahko vplivamo tudi z zmanjšanjem bremena mastocitov. Pri indolentni obliki mastocitoze se za zdravljenje s citostatiki večinoma ne odločimo. Danes imamo na voljo nova tarčna zdravila z delovanjem na tirozinske kinaze; avapritinib in midostavrin. Sam

avapritinib poleg manjšanja simptomov bolezni lahko vpliva tudi na pojavnost hude anafilaksije. V registracijski raziskavi avapritiniba tekom zdravljenja 5/7 bolnikov, s predhodnimi pogostimi anafilaktičnimi reakcijami, ni doživelo anafilaksije. Z zdravljenjem povezani neželeni učinki so bili zgolj stopnje 1-2. Pri zdravljenju indolentne mastocitoze je odmerek acapritiniba 25 mg dnevno.

Bolniki z anafilaksijo na strup Hymenoptere potrebujejo doživljenjsko imunoterapijo. Čeprav je tveganje za napredovanje indolentne mastocitoze v napreduvalno obliko malo, je bolnike potrebno spremljati s fizičnim pregledom, krvno sliko, oceno jetrnih encimov in ravnijo triptaze v serumu. Glede na nizko tveganje napredovanja je zadostno bolnika spremljati na dve leti.

Literatura:

1. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jul;36(7):1703-1719.
2. Joergensen MPP, Oevlisen AK, Jakobsen LH, El-Galaly TCC, Severinsen MT. Incidence and Prevalence of Mastocytosis in Adults: A Danish Nationwide Register Study. *Blood* 2023; 142 (Supplement 1): 6339.
3. Gotlib J, Kluin-Nelemans HC, George TI, Akin C, Sotlar K et al. Efficacy and Safety of Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis. *N Engl J Med*. 2016;30;374(26):2530-41.
4. Gotlib J, Castells M, Elberink HO, Siebenhaar F, Hartmann K et al. Avapritinib versus Placebo in Indolent Systemic Mastocytosis. *NEJM Evid*. 2023 Jun;2(6):EVIDoa2200339.
5. Trizuljak J, Sperr WR, Nekvindová L, Elberink HO, Gleixner KV et al. Clinical features and survival of patients with indolent systemic mastocytosis defined by the updated WHO classification. *Allergy*. 2020 Aug;75(8):1927-1938.

6. Rijavec M, Inkret J, Bidovec-Stojković U, Carli T, Frelj N et al. Fatal Hymenoptera Venom-Triggered Anaphylaxis in Patients with Unrecognized Clonal Mast Cell Disorder-Is Mastocytosis to Blame? *Int J Mol Sci.* 2023;24(22):16368.
7. McComish JS, Slade CA, Buizen L, Paul SK, Chatelier JW et al. Randomized controlled trial of omalizumab in treatment-resistant systemic and cutaneous mastocytosis (ROAM). *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2023;11(7):2248-2250.e3.
8. Distler M, Maul JT, Steiner UC, Jandus P, Kolios AGA et al. Efficacy of Omalizumab in Mastocytosis: Allusive Indication Obtained from a Prospective, Double-Blind, Multicenter Study (XOLMA Study). *Dermatology.* 2020;236(6):529-539.
9. Broesby-Olsen S, Vestergaard H, Mortz CG, Jensen B, Havelund T et al. Omalizumab prevents anaphylaxis and improves symptoms in systemic mastocytosis: Efficacy and safety observations. *Allergy.* 2018;73(1):230-238.
10. T. Pongdee, C. Arana Yi, I. Dybedal, K. Newberry, P. Vachhani. Anaphylaxis in patients with indolent systemic mastocytosis (ISM): A severe, potentially life-threatening complication. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2023;131(Supplement 1).
11. Rossini M, Zanotti R, Orsolini G, Tripi G, Viapiana O et al. Prevalence, pathogenesis, and treatment options for mastocytosis-related osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2016;27(8):2411-21.
12. Orsolini G, Gavioli I, Tripi G, Viapiana O, Gatti D et al. Denosumab for the Treatment of Mastocytosis-Related Osteoporosis: A Case Series. *Calcif Tissue Int.* 2017;100(6):595-598.

Strokovni sestanek medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v hematologiji (SMSZT)

Uspešnost zdravljenja s CAR-T pri otrocih UKCLJ PEK

Tamara Novak, Katarina Miklič

Klinični oddelek za otroško hematologijo in onkologijo, UKC Ljubljana, Pediatrična klinika

UVOD

CAR (Chimeric Antigen Receptors)-T so izven telesno gensko spremenjeni limfociti T, ki mu omogočimo vezavo na specifične beljakovine.

Car-T je individualizirana metoda zdravljenja saj je potrebno za vsakega bolnika izdelati zdravilo iz njegovih celic. Iz venske krvi s postopkom afereze zberemo T limfocite, ki jih v specializiranih laboratorijih aktivirajo in jih s pomočjo virusnega vektorja opremijo z genskim zapisom za tarčni protein CD19 na maligni celici. Na pediatrični kliniki, v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana se uporablja terapija s CAR-T usmerjena proti tarčnemu proteinu CD19. Indikacija za zdravljenje s CAR-T pri pediatričnih bolnikih, ki so stari do 25 let je B-celična ALL (akutna limfoblastna levkemija), neodzivna na kemoterapijo, relaps po presaditvi KMC, drugi ali kasnejši relaps ali če bolnik ni primeren kandidat za PKMC (presaditev krvotvornih matičnih celic).

POTEK IN PRIPRAVA NA ZDRAVLJENJE S CAR-T

Bolnika sprejmemo 7 dni pred aplikacijo zdravila, namestimo ga v sobo z interlock sistemom zapiranja vrat in uvedemo sterilno dieto. Pred aplikacijo zdravila pri bolniku izvedemo limfodeplecijo s KT (kemoterapijo) (fludarabin, ciklofosfamid). Zdravilo je priporočeno aplicirati 2-14 dni po zaključku limfodeplecije s KT. Pred uvedbo limfodeplecije je potrebno zagotoviti, da imamo zdravilo Kymriah in vsaj štiri odmerke zdravila Tocilizumab na razpolago.

PRIPRAVA BOLNIKA

- preverimo, identiteto bolnika s podatki na pripravku (ime, priimek, datum rojstva, krvna grupa)
- -po odmrzovanju, je potrebno pripravek aplicirati v roku 30 minut
- za preprečevanje reakcije prejme bolnik 30 do 60 minut pred aplikacijo pripravka premedikacijo. Uporaba kortikosteroidov je prepovedana razen, v primeru življenjske ogroženosti bolnika.

SPREMLJANJE BOLNIKA PO PREJEMU ZDRAVILA

Prvih 14 dni po aplikaciji je potrebno bolnika dnevno spremljati glede znakov sindroma sproščanja citokinov (CRS), nevroloških dogodkov in drugih toksičnih učinkov. Bolnik naj po 14 dnevih do 4 tedne po aplikaciji ostane oddaljen največ 1 uro do bolnišnice.

SPREMLJANJE PACIENTA NA ODDELKU

- telesna temperatura 1x na izmeno oz. 3x/dan in 1x ponoči, v kolikor ima povišano telesno temperaturo pogosteje;
- vitalne funkcije 3x/dan in 1x ponoči, v primeru nestabilnega pulza 2x/izmeno oz. pogosteje;
- bilanca tekočin /12 h;
- 1x dnevno odvzem CRP (C-reaktivni protein), fibrinogen, jetrni testi, feritin
- spremljanje nevroloških neželenih znakov (pojavi se v prvih 8ih dneh) kot so encefalopatija, epileptični napadi, zmedenost, delirij, razdražljivost, motnje govora in pisave (pogost prvi znak nevrotoksičnosti). Zato pri bolniku 2x dnevno preverjamo fino motoriko tako, da bolnik napiše določen stavek, pri manjših otrocih pa 2x dnevno nariše nek znak (krog).

ZAPLETI

CRS se najpogosteje razvije v času 1-10 dni, največkrat 3 dni po aplikaciji.

1.STOPNJA:

- tel.temperatura 38°C ali več
- RR normalen
- Sat O2 normalna

Ukrepi:

Opazovanje, izključimo možnost okužbe, ob nevtropeniji uvedba antibiotika, simptomatsko zdravljenje, če v 3 dneh ni izboljšanja in ni vzroka težav bolnik prejme tocilizumab.

2.STOPNJA

- tel. temperatura 38°C ali več
- blaga hipotenzija (niso potrebni vazopresorji)
- hipoksija (potreben dodatek O2 do 6 L/min preko nosnega katetra)

Ukrepi: antibiotik in simptomatsko zdravljenje, tocilizumab (če v 12ih urah ni izboljšanja ga ponovimo), ob vztrajanju težav bolnik prejema dexamethason 1-3 dni, obvestimo enoto za intenzivno terapijo.

3.STOPNJA:

- telesna temperatura 38°C ali več
- hipotenzija (potrebni vazopresorji)
- hipoksija (potreben dodaten O2 več kot 6 L/min preko obrazne ali preko Venturi maske)

Ukrepi: antibiotik in simptomatsko zdravljenje, tocilizumab (če v 12ih urah ni izboljšanja ga ponovimo), dexamethason 1-3 dni, premestitev v enoto za intenzivno terapijo, če težave vztrajajo se odmerek dexamethasona podvoji.

4.STOPNJA

- telesna temperatura 38°C ali več
- potrebna večtirna vazopresorna podpora
- potrebna dihalna podpora s pozitivnim tlakom, (intubacija ali mehanska ventilacija)

Ukrepi: enako kot pri prejšnji stopnji, ob vztrajanju se doda visoke odmerke prednisolona.

Predstavitev primerov povzeta iz zdravstvene dokumentacije bolnikov zdravljenih s CAR-T

1. primer:

6 let stara deklica zbolí 11.2019 z ALL -B celično, zaradi neugodne KRAS mutacije prične zdravljenje s HR terapijo.

4. 2020 je kot prva v Sloveniji zdravljena s CAR-T

Po prejemu CAR-T je bila :

- subfebrilna do 37,8°C (6., 7. dan);
- tahikardna do 140 (6., 7. dan);
- navaja blage bolečine v okončinah;
- vnetni parametri negativni, IL-6 v mejah normale, porast limfocitov, padec nevtrofilcev, ter predhodno porast feritina;
- težave po 8 dnevu spontano izzvenijo;
- nima nevroloških odstopanj;
- 14. dan odpustimo v domačo oskrbo;
- po odpustu večkrat potrebovala imunoglobuline;

- 6.2020 potrjen relaps bolezni;
- 9.2020 narejena TKM nesorodnega skladnega dajalca.

2. primer:

19 letno dekle z ALL-B celično je po prvem zdravljenju imela relaps bolezni, sledi TKM, po katerem ponovno relapsira

- 8.6.2022 uvedba Keppre zaradi predhodne abnormalne nevrološke simptomatike ob prejemu podobne citostatske terapije;
- 15. do 18.6 limfodeplecija;
- 5.7.2022 prejem CAR-T celic.

PO PREJEMU CAR-T:

- občasno hipotenzivna (vazopresorji niso potrebni)
- nima nevroloških odstopanj (pred CAR-T je uveden Levotiracetam profilaktično)
- ves čas prejemale antibiotično terapijo v sklopu zdravljenja sepse, ki je bila pred infuzijo CAR-T
- zaradi izgube teže ji uvedemo hranjenje po NGS in TPP
- pred odpustom potrebuje imunoglobuline
- 14. dan jo odpustimo v domačo oskrbo
- 27.7.22 je imela pri nas zadnji kontrolni pregled, nadaljnje sledenje ima dekle izven Slovenije

3. primer:

Deček star 12 let zboli za pre B ALL

- 1.3.2021 prične zdravljenje po protokolu ALL IC BFM 2009;
- 5.3.2023 zaključi intenzivno in vzdrževalno zdravljenje;
- 23.5.2023 pride do zgodnjega relapsa ALL, ki se kaže kot infiltracija levega testisa;
- 18. do 21.7 limfodeplecija;
- 24.7.2023 prejem CAR-T.

PO PREJEMU CAR-T:

- 2. dan po prejemu CAR-T celic febrilen do 38,1°C, ki spontano pade, pobrane so bile hemokulture (negativne);
- 4. dan se pri dečku pojavijo rdeči neboleči mehurčki, napoljeni s prozorno tekočino, opravili smo bris mehurčka iz katerega smo izolirali varicella zoster virus (uveden aciklovir);
- 7. dan je ponovno postal febrilen do 38,8°C, temperatura spontano pade, pobrane hemokulture (negativne);
- nima nevroloških odstopanj (profilaktično uveden Levotiracetam);
- po 14 dneh ga odpustimo v domačo oskrbo;
- po odpustu večkrat potrebuje imunoglobuline;
- 21.9.2023 zgodnja izguba B celične deplecije (ocena deleža CAR-T limfocitov);
- 30.10.2023 narejena TKM sorodnega skaldnega dajalca.

4. primer

20 letni fant zboli za bifenotipsko ALL (pre T/B)

- 5.7.2021 prične z zdravljenjem po protokolu ALL IC BFM 2009;
- marca 2022 zaključi intenzivno zdravljenje in prične z vzdrževalnim zdravljenjem;
- 18.10.2022 je potrjen relaps bolezni (blasti v likvorju);
- 5. do 9.1.2023 limfodeplecija s KT;
- 12.1.2023 prejem CAR-T.

PO PREJEMU CAR-T:

- 13.1 je postal febrilen do 38.6°C, pobrali smo hemokulture, prejel je antipiretik, temperatura mu je padla, drugih težav ni imel, imel je povišan CRP;
- občasno febrilen, ob antipiretiku temp. pade;
- 15.1 popoldan febrilen z mrzlico, odvzete so mu bile hemokulture in uvedena mu je bila dvotirna antibiotična terapija, prejel je antipiretik, temp. mu je padla, imel nižji RR in prejel je bolus tekočin in RR se za nekaj časa nekoliko dvigne;
- v noči 15. na 16.1 še vedno febrilen, temperatura kljub antipiretiku ne pade, RR nekoliko nižji, ker stanje z nizkim RR in visoko temp. vztraja, kljub ukrepom prejme Tocilizumab;
- RR se nekoliko dvigne in temp. mu pade ob tem je bradikarden;
- 16.1. je še vedno febrilen, ob tem ga po telesu mrazi, pojavi se glavobol in ima nižji RR, prejme Tocilizumab, dodajo še Deksamethason;
- po aplikaciji zdravil so VF stabilne;
- 17.1 počasi se stanje umiri, ukinemo Tocilizumab, deksamethason in en antibiotik, občasno še subfebrilen;

- 14 dan fanta odpuščamo v domačo oskrbo;
- po odpustu večkrat potrebuje imunoglobuline.

5. primer

11 letni deček k nam prišel po 2. relapsu, kjer je bil 4.4.2023 narejen CAR-T

- limfodeplecija 27.3. do 30.3.;
- antibiotična th. že pred sprejemom (febrilno stanje do vključno 12.4.);
- zaradi neješčnosti prejema TPP;
- 14. dan ob odpustu afebrilen, prejme še imunoglobuline;
- čez 14 dni odpuščen, umre istega leta zaradi sekundarne AML;

ZAKLJUČEK

Do sedaj smo na Pediatrični kliniki v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana zdravili z CAR-T bolnike, ki imajo B-ALL. V prihodnosti načrtujemo zdravljanje s CAR-T tudi za druge bolezni v hematologiji in onkologiji.

Literatura

www.eu.europa.eu/en/documents/product-information/kymriah-epar-product-information

Nevroblastom- vloga medicinske sestre pri pripravi imunoterapije

Tehvida Ponjević

Pediatrična klinika, klinični oddelek za otroško hematologijo in onkologijo

tehvida.ponjevic@kclj.si

Povzetek: Nevroblastom je maligni neuroendokrini tumor, ki izvira iz primitivnih celic simpatičnega živčnega sistema. Najpogosteje se pojavi v nadledvični žlezi, vendar se lahko primarna mesta razlikujejo od diencefalona do medenice. Najpogosteje se diagnosticira pri otrocih, mlajših od 5 let, pri čemer je povprečna starost pri postavitvi diagnoze 17 mesecev. Približno 40 do 50 odstotkov otrok ima lokaliziran ali regionalno razširjen tumor ob postavitvi diagnoze, od 50 do 60 odstotkov otrok ima ob postavitvi diagnoze oddaljene metastaze. Klinična slika se razlikuje glede na primarno mesto tumorja in prisotnost metastaz. Vključuje lahko abdominalno maso, proptozo, podkožne podplutbe okoli oči, Hornerjev sindrom, maso v predelu hrbtenice, nevrološke izpade, težave z odvajanjem urina ali blata in opsoklonus-mioklonus-ataksijo. Za diagnosticiranje nevroblastoma se uporabljajo različne laboratorijske in slikovne metode. Dokončna diagnoza temelji na patohistoloških ugotovitvah. Zdravljenje nevroblastoma obsega imunoterapevtsko (anti-GD2 protitelesa), kemoterapevtsko in kirurško zdravljenje, ter obsevanje in avtologno transplatacijo kostnega mozga. Medicinska sestra ima pomembno vlogo pri pripravi bolnika na aplikacijo terapije, opazovanju bolnika med imunoterapijo in varnem rokovanju z zdravili.

Uvod

Nevroblastom je maligni tumor, ki nastane v živčnem tkivu, poteka v obliki verige vzdolž zadnjega dela vratu, prsnega koša in trebuha. Najpogosteje se pojavi v trebuhu. V Sloveniji se odkrije povprečno pri 3–4 otrocih letno, večinoma v starosti do petih let in je vzrok 15 % smrti zaradi raka v otroštvu (2). Pri otrocih, ki imajo nevroblastom in so mlajši od dveh let, navadno opazimo zatrdlino v trebuhu, vročino in izgubo telesne teže. Včasih imajo otroci zelo nejasne težave. Lahko jih bolijo noge, počutijo se utrujeni, izgubijo tek, nastopijo težave pri hoji in odvajanju urina, pojavi se temnejša obarvanost okoli oči (očalni hematomi), dihalna stiska, zožena zenica na enem očesu ob manjšem in bolj vdrtem očesu. Tipljemo lahko zatrdlino v trebuhu, na vratu ali v dimljah. Pri starejših otrocih se lahko zgodi, da tumorja ne opazimo, dokler zasevki ne povzročijo hepatomegalije, ascitesa ali bolečin v kosteh (3).

Diagnostika

Pred začetkom zdravljenja moramo ugotoviti razširjenost, da lahko bolezen uvrstimo v stadij in temu prilagodimo intenzivnost zdravljenja. S kostno punkcijo odvzamemo kostni mozeg in naredimo slikovno diagnostiko (RTG, UZ, CT, MIBG) (1). Po opravljenem slikovnem diagnosticiranju se v večini primerov odločimo za citološko punkcijo tumorja pod nadzorom ultrazvoka (2). Nevroblastom pogosto metastazira, predilecijska mesta za zasevke so področne bezgavke, jetra, pljuča, kosti, kostni mozeg, očesna votlina in redkeje koža. Približno 90 % nevroblastomov tvori kateholamine, ki so pomembni pri klinični predstavitvi - zvišana raven kateholaminov v krvi in njihovih derivatov v urinu (3).

Zdravljenje

V prvem letu otrokove starosti se lahko srečamo s prognozično zelo ugodno obliko nevroblastoma, ki se lahko brez kakršnega koli zdravljenja spontano umakne. Pri lokaliziranih tumorjih z ugodno genetsko prognozo, kar je pri nevroblastomu redko, zadostuje le operacija. Pri razširjenem tumorju oz. prognozično neugodnih oblikah je potrebna intenzivna kemoterapija, operacija, obsevanje in avtologna presaditev kostnega mozga. Zdravljenje zaključimo z imunsko

terapijo in z infuzijami antigangliozidnih protiteles. Uspešnost zdravljenja vseh oblik nevroblastoma je približno 70 % (2). Za nevroblastom je specifičen stadij IV S, ki ga opredelimo kot majhen primarni nevroblastomski tumor pri otroku, mlajšem od 12 mesecev, pri katerem so prisotni zasevki v jetrih, koži in kostnem mozgu. V večini primerov pri teh otrocih kljub prisotnosti oddaljenih zasevkov pride do spontanega zmanjšanja tumorja brez terapevtskega posega (3). Dejavniki, ki vplivajo na izid bolezni so: starost bolnika ob postavitvi diagnoze, velikost tumorja in prisotnost oddaljenih zasevkov. Prognoza je pri bolnikih v nizkem stadiju bolezni odlična (stadij I: 90-100 odstotno petletno preživetje), pri bolnikih v višjem stadiju bolezni (40-50 % vseh bolnikov z nevroblastomom) so rezultati zdravljenja še vedno slabi in le redke raziskave poročajo o več kot 30 odstotnem petletnem preživetju pri bolnikih v stadijih III in IV (2).

Imunoterapija

Nevroblastom izstopa med otroškimi rakavimi tumorji kot primer, kjer je imunoterapija (z anti-GD2 protitelesi) vključena tako v protokole zdravljenja v prvi liniji kot tudi ob ponovitvi, da bi bistveno izboljšala izide zdravljenja za bolnika in povečala stopnjo ozdravitve (1). Dinutuximab beta (Qarziba) je del protokola zdravljenja in se aplicira v petih ciklih vsakih 5 tednov. Prvi cikel se začne 7-10 dni po koncu prvega cikla 13-cis-RA (Roaccutane). Bolniki prejemajo dinutuximab beta neprekinjeno 10 dni v vsakem ciklu. Vsak odmerek se izračuna glede na telesno površino ali telesno težo bolnika (4). Aplikacija dinutuximab beta se prične v bolnišničnem okolju, kar nam omogoča lažji nadzor nad bolnikovim kliničnim stanjem. Aplikacija zdravila poteka preko infuzijskih črpalk, zdravilo je v lekarni pripravljeno v brizgah, steklenicah ali v vrečkah (5). Za nemoteno aplikacijo zdravila uporabljamo centralni venski kateter s podkožnim prekatom, periferno uvedeni centralni venski kateter (PICC) ali pa centralni venski kateter (CVK), na katerega priključimo dva infuzijska sistema (eden za aplikacijo imunoterapije, drugi za podporno terapijo in premedikacijo) (1).

Za lažje nadzorovanje nevropatične bolečine apliciramo gabapentin v ustreznih odmerkih, neopioidne analgetike (paracetamol, metamizol, ibuprofen) in opioidne analgetike (morfij), za aplikacijo slednjega vzpostavimo subkutani kateter (4). Za preprečitev in ublažitev alergijskih

reakcij (urtikarija, vročina, bronhospazem, hipotenzija), ki lahko nastanejo kot posledica sproščanja citokinov pred aplikacijo imunoterapije je priporočljiva uporaba antihistaminika (Clemastine), katerega aplikacijo lahko po potrebi tudi ponovimo (5). Capillary leak syndrome ali sindrom vaskularnega puščanja, se kaže kot ekstravazacija plazemskih beljakovin in tekočine v ekstravaskularni prostor (okoliška tkiva, mišice, organi ali telesne votline). Običajno se razvije v nekaj urah po začetku zdravljenja, medtem ko se klinični simptomi (hipotenzija, tahikardija) pojavijo po 2 do 12 urah (4). Potrebno je skrbno spremljanje vitalnih funkcij, telesne temperature, telesne teže, obseg trebuha in vodenje tekočinske bilance pri bolniku.

Če bolnik terapijo dobro prenaša in potrebuje minimalno podporno terapijo v peroralni obliki, se bolnika lahko odpusti v domačo oskrbo. V tem primeru bo aplikacija imunoterapije potekala doma, bolnik bo v ambulanto ali na oddelek prihajal na menjavo zdravila. Za ta namen se lahko uporabljajo elastomerni infuzijski sistemi (5).

Zdravljenje z dinutuximabom beta je potrebno trajno prekiniti ob pojavu (4):

- anafilaksije stopnje III ali IV
- podaljšane periferne motorične nevropatije stopnje II
- periferne nevropatije stopnje III
- toksičnosti vida stopnje III
- hiponatremije stopnje IV kljub ustrezni tekočinski terapiji
- ponavljajočega ali kapljičnega sindroma stopnje IV (zahteva podporo ventilatorja).

Zaradi bolnikove imunosupresivne aktivnosti je sočasno zdravljenje s kortikosteroidi odsvetovano v obdobju 2 tednov pred prvim ciklom zdravljenja in 1 teden po zadnjem ciklu zdravljenja z dinutuximabom beta, razen v primerih, ko gre za življenjsko ogrožajoče stanje. Odsvetovana je tudi sočasna uporaba intravenskih imunoglobulinov (5).

Literatura

2. Anderson J, Majzner R. G, Sondel P. M. 2022. Immunotherapy of Neuroblastoma: Facts and Hopes. American Association for Cancer Research. [cited 2024 march 10]. Available from Immunotherapy of Neuroblastoma: Facts and Hopes - PubMed (nih.gov).
3. Anžič J, Benedik Dolničar M, Burger Lazar M, Jazbec J, Rožič M, Širca Čampa A, idr. 2018. Ko otrok zboli z rakom. Ustanova za pomoč otroku z rakom, Bohoričeva 20, 1000 Ljubljana.
4. Kržišnik C, Anderluh M, Arnež M, Avbelj Stefanija M, Avčin T, Battelino T, idr. 2013. Pediatrija. DZS, Ljubljana.
5. Ladenstein R, Pötschger U, Valteau-Couanet D, Luksch R, Castel, V, Ash S, Laureys G, Brock P, Michon J.M, Owens C, et al. Investigation of the Role of Dinutuximab Beta-Based Immunotherapy in the SIOPEL High-Risk Neuroblastoma 1 Trial (HR-NBL1). *Cancers* 2020, 12, 309. [cited 2024 march 10]. Available from [Cancers | Free Full-Text | Investigation of the Role of Dinutuximab Beta-Based Immunotherapy in the SIOPEL High-Risk Neuroblastoma 1 Trial \(HR-NBL1\) \(mdpi.com\)](#).
6. Pasqualini C, Valteau-Couanet D, Ladenstein R. High-risk neuroblastoma standard clinical practice recommendations. 2020. SIOP Europe – the European Society of Paediatric Oncology and the European Reference Network for Paediatric Oncology (ERN PaedCan). [cited 2024 march 10]. Available from [escp-high-risk-neuroblastoma-standard-clinical-practice-recommendations.pdf \(siope.eu\)](#).

Zahtevna vloga medicinskih sester v terapevtskih aferezah

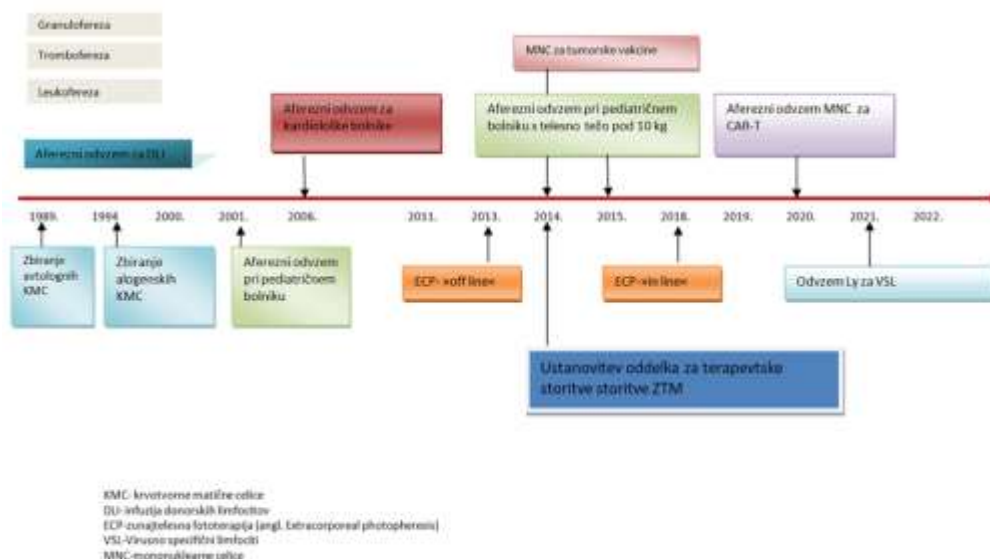
Stanislava Žlebnik

Zavod RS za transfuzijsko medicino,

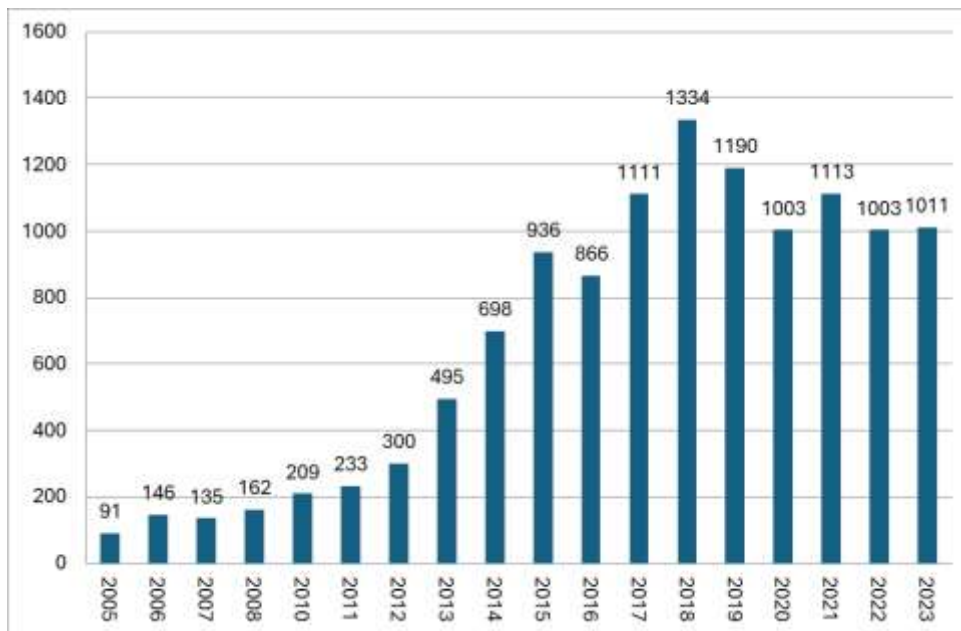
stanislava.zlebnik@ztm.si

Terapevtske afereze so navkljub ključni vlogi celičnega zdravljenja relativno malo poznano področje v praksi zdravstvene nege. Izvajanje tovrstnih postopkov od izvajalcev zahteva večšine in znanja, ki zagotavljajo razumevanje procesov in uspešno izvedbo postopkov pri bolnikih ali zdravih darovalcih. Terapevtske afereze vključujejo ločevanje in odstranjevanje krvnih komponent z namenom posrednega ali neposrednega zdravljenja stanj, ki zajemajo širok spekter kliničnih posebnosti. Specializirano znanje medicinskih sester je potrebno za izvajanje postopkov in nepogrešljivo za preprečevanje, prepoznavo in obravnavo morebitnih stranskih učinkov.

Zaradi naraščanja števila aferezni postopkov in specifičnih zahtev se je pokazala nujna potreba po ustanovitvi oddelka za terapevtske storitve (OTS), ki je bil uradno ustanovljen leta 2014.



Slika 1: Zavod za transfuzijsko medicino (ZTM) kronologija aferezni postopkov



Slika 2: število afereznih postopkov na ZTM po letih

OTS je edini center za področje celotne Slovenije, ki izvaja terapevtske aferezne postopke. Naraščajoče število bolnikov in potreb po celičnem zdravljenju prinaša nove izkušnje, rezultate ter izzive za vse vpletene izvajalce.

Med postopkom afereze se krvne sestavine bolnika ali darovalca ločujejo ali odstranjujejo s kontinuiranim pretokom krvi iz (običajno) kubitalne vene do celičnega ločevalca in vračajo z odstranjenimi celicami v veno druge roke.

Centrifugalna sila, ki se vzpostavi med delovanjem celičnega ločevalca in zbiralna črpalka, omogočita ločevanje in posledično zbiranje celic v komori glede na njihovo velikost.

Sodobni celični ločevalci omogočajo učinkovito ločevanje in zbiranje mononuklearnih celic (MNC) iz periferne krvi z izbranim ustreznim programom, ki temelji na specifični teži ali velikosti celic (Potok, 2016).

Različne aferezne postopke omogoča izbira med različnimi celičnimi ločevalci in izbranimi programskimi protokoli. Pri izbiri celičnega ločevalca in protokola odvzema se upošteva merilo namena uporabe celic in klinične značilnosti bolnika. Zbiranje mononuklearnih celic (MNC) iz periferne krvi s postopkom afereze predstavlja začetni korak pri pripravi večine celičnih terapij.

Celično zdravljenje premika meje v velikokrat skoraj ključni vlogi pri zdravljenju težkih bolezni in stanj. V terapevtskih aferezah zato tudi bledijo omejitve glede starosti in teže bolnikov, kar potrjuje dejstvo, da se terapevtske afereze uspešno opravljajo tudi pri pediatričnih bolnikih. Širok nabor kliničnih značilnosti, kot tudi posebnosti bolnikov, narekuje premišljeno načrtovanje in tehtanje vseh kriterijev za uspešnost pri izvedbi terapevtskih aferez.

Diagnoze, ki zahtevajo terapevtske afereze, so povezane s kemoterapijo, imunosupresivnim zdravljenjem, slabim stanjem kože (Sezary sindrom, T-celični limfom z eritrodermijo), slabo hidriranostjo (črevesna oblika GVHD) in posledično vodijo v otežen periferni venski dostop. Dolgotrajno zdravljenje posledično privede tudi do sprememb na perifernem žilju in oteženem venskem dostopu. Otežen venski dostop je izziv, s katerim se medicinska sestra s podporo ostalih članov afereznega tima sooča in dnevno preizkuša pridobljene veščine, izkušnje in predanost. Aferezni postopki v osnovi temeljijo na neprekinjenem pretoku krvi od bolnika do celičnega ločevalca in nazaj, venski dostop je ključnega pomena za uspešen aferezni postopek, kar nemalokrat predstavlja dodatno psihično obremenitev tako za bolnike kot za izvajalce. Alternativno možnost izvedbe postopka preko osrednjih venskih katetrov se izbere za pediatrične bolnike in odrasle bolnikih, ko ni možnosti za uspešno venepunkcijo perifernih ven. Bolniki z oteženim venskim dostopom imajo pogosto nižjo toleranco do venepunkcije in je zato pomembno, da se z bolnikom vzpostavi odnos, ki zagotavlja medsebojno sodelovanje, zaupanje in potrebno mero motiviranosti za zdravljenje.

V naboru afereznih postopkov predstavlja zunajtelesna fototerapija (ZTF) afereznemu timu še dodaten izziv zaradi dejstva, da se ZTF (z razliko od ostalih postopkov) izvaja, vsaj na začetku zelo pogosto, in tudi dolgotrajno.

V primeru urgentnih stanj se postopki izvajajo na kliničnih oddelkih ali enotah za intenzivno nego in terapijo. Ta aspekt odkriva tudi potrebo po 24-urni pripravljenosti, ki poleg urgentnih postopkov zajema tudi postopke zbiranja in infuzije matičnih celic. Nabor različnih postopkov narekuje uporabo različnih celičnih ločevalcev in programske opreme, kar zahteva tehnične veščine in usposobljenost posameznikov za skrbno ravnanje z opremo, ki je draga in težko dostopna. Zahteve sistema kakovosti in sledljivosti so povezane z doslednim administrativnim delom, ki enakovredno prispeva h končni uspešnosti. Sledenje načelom vzdrževanja varnega okolja za bolnike, za izvajalce in upoštevanje varnostnih ukrepov za obvladovanje okužb, kot tudi odgovorno ravnanje z opremo, je za izvajalce terapevtskih aferez ključnega pomena. Postopki so dolgotrajni in zato naporni za bolnika. Od izvajalcev se zahteva pozornost, predvidevanje in prepoznavanje potencialnih neželenih učinkov in hujših zapletov vezanih na postopek afereze. Psihično stanje bolnikov zahteva posebno pozornost in zrelost izvajalcev. Poleg tehničnih so potrebne tudi socialne in komunikacijske veščine, ki medicinski sestri v terapevtskih aferezah omogočajo prepoznati bolnikove/darovalčeve potrebe. Aktivno poslušanje, profesionalna vprašanja in nagovor bolnika/darovalca s potrebnimi informacijami, zelo pomagajo pri premagovanju strahu in vzpostavljanju zaupanja. Tak odnos je potreben ne samo do bolnikov/darovalcev, temveč tudi njihovih sorodnikov, ki so čustveno vpleteni v celoten proces. Vsak človek ima svojo zgodovino, način življenja, razmišljanja in delovanja. Zasluži si popolno spoštovanje, brez razlik in brez predsodkov (Neyrinck, Vrieling, 2019)

Terapevtske afereze kot osnovni postopki za sodobna celična zdravljenja so slabo poznani postopki, ki zahtevajo specializirano znanje in tehnično usposobljenost medicinskih sester. V naboru različnih postopkov in bolezni, se medicinska sestra pri svojem delu sooča z izzivi, ki zahtevajo znanje, administrativne, tehnične, socialne in komunikacijske veščine. S poznavanjem postopkov in ciljev zdravljenja, zmožnostjo opazovanja, presojanja in profesionalnega sledenja bolnikovim/darovalčevim potrebam, se izkazuje njena nepogrešljiva in zahtevna vloga.

Oddelek za terapevtske storitve - Center za afereze je edini center v Sloveniji, ki opravlja terapevtske afereze. Pridobljena JACIE akreditacija je znak kakovostnega dela in zaslug vseh članov afereznega terapevtskega tima. ZTM je prva javna institucija v Sloveniji, ki je pridobila

certifikat dobre proizvodnje prakse (GMP- Good Manufacturing Practice). Z vsemi izkušnjami, pridobljenimi z leti uspešnega dela, smo se pripravljene soočiti z novimi izzivi, ki jih prinašajo novosti na področju celičnega zdravljenja.

Literatura:

1. Potok. D., et al. (2016). The nurse`s role in therapeutic apheresis. Nursing times; 112: online issue (2), 4-6.
2. Neyrinck Marleen M., H. Vrieling. (2019). Performance of an apheresis procedure: The apheresis nurse-operator and nursing aspects. Transfusion and Apheresis Science 58, 296-299. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.04.017>

Strategije spoprijemanja in zaščitni faktorji medicinskih sester v paliativni oskrbi

Maša Zapušek

Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana

mzapusek98@gmail.com

Uvod

Medicinske sestre (MS) uporabljajo raznolike proaktivne in premišljene strategije, da bi se lažje spopadale z izzivi, ki jih prinaša paliativna oskrba. Raziskave so pokazale, da sta »čas« in »izkušnje«, ki jih imajo MS pogosto ključni faktorji k lažjemu spopadanju z izzivi, ki jih prinaša oskrba paliativnega bolnika. Strategije spoprijemanja, razumljene kot sklop različnih dejavnosti, pa vendar niso neprepustne pregrade. MS jih združujejo glede na svoje potrebe in razvoj v soočanju z izzivi.

Strategije

Proaktivno spoprijemanje (delovanje – usmerjeno v ukrepanje) združuje sklop dejavnosti, v katerih MS prevzemajo »vedenja«, osnovana na soočanju s situacijami na proaktiven način. Značilno je iskanje samozavesti in nadzora nad situacijami ter lastnimi čustvi, da bi se čim bolje soočili s težavami. Vključuje tri glavne vrste dejavnosti MS:

- prevzemanje odgovornosti do sebe, svojih bolnikov in družin kot aktivno strategijo spoprijemanja;
- načrtovanje in organiziranje svojega dela, da bi pridobile samozavest;
- obvladovanje situacij tako, da nadzirajo vidike, povezane s svojo prakso, s samim seboj in svojimi čustvi.

Glavne dejavnosti spoprijemanja na podlagi samooskrbe (osredotočanje na ozaveščenost, ki upošteva lastno zaščito) se razvijajo na treh ravneh. Na prvi ravni MS spodbujajo samoosveščenost, poskušajo se bolje spoznati, s čimer spodbujajo osvobajajočo refleksijo. Na drugi ravni izvajajo dejavnosti samooskrbe, se odklopijo od dela in uporabljajo svoj prosti čas za počitek ter izvajanje hobijev in dejavnosti, da se »regenerirajo« (npr. slikanje, glasba, potovanje, vrtnarjenje, stik z naravo, meditacija, verski viri, druženje in obroki s prijatelji, družino, sodelavci). Na tretji ravni zdravstveni delavci izvajajo vedenjsko izključevanje, tj. začasno ščitenje sebe, tako da delo odložijo, da ga ne prinesejo domov in o njem ne razmišljajo, poleg tega se čustveno ločijo od svojih bolnikov, s psihološko ločitvijo od nedavno preminulih bolnikov.

Spoprijemanje s samo-preobrazbo (prilagajanje – napredovanje s sprejemanjem svojih osebnih in poklicnih omejitev) poteka skozi proces nenehnega razmisleka, sčasoma pregledovanja in včasih preoblikovanja vrednot in pomenov v življenju. Vključuje štiri glavne vrste dejavnosti, v katerih MS:

- sprejemajo omejitve kot osebe in priznavajo potrebo po ohranjanju poklicnih meja, premagovanju začetnih frustracij, razmišljanju, da ni njihova krivda, da so bolniki bolni, in priznavanju lastnih omejitev;
- kopičijo izkušnje s časom, poklicno zrelostjo, večje usposabljanje in odpornost;
- iščejo ravnotežje in harmonijo v svojem osebnem življenju, iščejo zdravo ravnovesje med delom in življenjem;
- pregledujejo življenjske vrednote, s (ponovnim) pomenom smrti, sprejemanje je kot nekaj naravnega in soočanje z lastno umrljivostjo; pride lahko tudi do obnovitve pomena življenja.

Strategije spoprijemanja, ki temeljijo na pomenu in namenu v življenju, so bile v raziskavah statistično povezane z boljšimi rezultati v dimenzijah izgorevanja.

MS doživljajo globok pomen svojega dela, čutijo zadovoljstvo pri delu in se strokovno razvijajo. Spoprijemanje v slogu srečevanja z globokim profesionalnim pomenom (doživljanje globljega

pomena svojega dela) vključuje: občutek zunanje poklicne (ponovne) cenitve, občutek dosežka in pomena opravljenega dela ter občutek, da njihova zdravstvena oskrba naredi razliko. Bolniki in družinski člani cenijo in potrjujejo zdravstveno oskrbo, ki jo ti strokovnjaki nudijo, to pa zdravstvene delavce napolni z zadovoljstvom in izpolnjenostjo pri delu. Preoblikujejo svoja dejanja, sprejemajo odprte odnose, ki jih vodijo k realnim pričakovanjem, najdejo občutek koherentnosti in se z izzivi soočajo kognitivno. Pozitivna reinterpretacija je bila v raziskavah statistično povezana s poklicno in duhovno kakovostjo življenja.

MS, ki delajo v stresnih situacijah, lahko uporabijo tudi pristop po modelu G.R.A.C.E., tj. preprosta in učinkovita intervencija, ki je bila razvita za MS in druge zdravstvene delavce, da se lahko odzovejo bolj sočutno in z večjo jasnostjo in etično oporo, ko se trudijo najti sočutno pot skozi kompleksne klinične situacije. Model usmerja MS, da se na kratko ustavi, osredotoči svojo pozornost in da na kratko priključijo svoj namen. Temu kratkemu preverjanju sledi hitra samoocena v tri medsebojno povezana področja izkušenj: kratko opazovanje, kaj doživlja telo; kakšen je posameznikov čustveni ton in kakšne kognitivne pristranskosti so lahko prisotne. Temu sledi zaznavanje, kaj bolnik morda doživlja, nato preide na kratek proces notranje refleksije, preden neposredno vključi bolnika. Ta pristop je skladen z raziskavami o poklicni poti strokovnjakov v paliativni oskrbi, ki so opazili različne stopnje poklicnega razvoja in zrelosti.

Zaščitni faktorji in faktorji tveganja

Ustrezno usposobljen zdravstveni tim ima v skupini dinamičnih faktorjev večjo odpornost in boljše individualne spretnosti spoprijemanja s paliativnim bolnikom. Tako predstavlja počutje ustrezno usposobljenega: vir večje varnosti, samozavesti in pripravljenosti na soočanje s smrtjo bolnikov. Če primanjkuje usposabljanja, se zdravstveni delavci počutijo mentalno in čustveno nepripravljeni na soočanje s smrtjo bolnika. Ta faktor vključuje pomanjkanje znanja in/ali razumevanja filozofije med člani tima. To ustvarja nesoglasja glede ciljev zdravljenja, saj se razmišlja o bolj agresivnih ali invazivnih možnostih. Zdravstveni tim postane zaščitni faktor, ko ustvari ugodno delovno okolje, podpira sodelavce, deli izkušnje in ima dobro vodenje. Dejavniki tveganja lahko postane takrat, ko

je delovno okolje vir stresa. Ta situacija lahko izhaja iz medosebnih stisk, pomanjkanja v komunikaciji, težav pri odzivanju na spremembe, težav pri podpori znotraj tima ter malo priložnosti za deljenje izkušenj in čustev.

Poklicna motivacija ima prav tako pomemben vpliv in je zaščitni faktor takrat, ko so prisotni naslednji pozitivni vidiki: ljubezen in strast do opravljenega dela, poklicno poslanstvo, aktivna želja po delu na tem področju in da zdravstveni delavec ne dojema svojega dela kot posebej stresnega. Faktor tveganja postane takrat, ko obstajajo razhajanja med pričakovanji posameznikov, klinično realnostjo in pričakovanji članov tima. Prav tako je tveganje, če prvotno navdušenje pojenja, če ni doseženo ravnovesje ali če obstaja dojetje, da niso storili dovolj za bolnika. Družine zdravstvenih delavcev so zaščitni faktor, če nudijo podporo, vendar pa lahko predstavljajo tudi tveganje. Družine, ki predstavljajo tveganje, prinašajo izzive, šokantne, čustvene izkušnje in z njimi povezane negativne občutke do zdravstvenega delavca.

Zaključek

Paliativna oskrba predstavlja kompleksno področje dela MS, ki zahteva ne le strokovnost in znanje, temveč tudi močno čustveno in duševno odpornost. Raziskave jasno kažejo, da so ključni dejavniki uspešnega spoprijemanja s temi izzivi čas in izkušnje. Vendar pa se MS ne zanašajo le na te dejavnike. Aktivno uporabljajo tudi raznolike strategije za spopadanje z izzivi, ki jih prinaša njihovo delo in okolje. Različne strategije spoprijemanja se združujejo in prilagajajo glede na individualne potrebe in razvoj MS ob soočanju z izzivi. Zaščitni faktorji so ključnega pomena pri ohranjanju psihičnega zdravja, dobrega počutja in lahko bistveno prispevajo k zmanjšanju tveganja za izgorelost in izčrpanost MS. Model sočutja po G.R.A.C.E dodatno poudarja pomen sočustvovanja in empatije tako za bolnike kot tudi za zdravstveno osebje. Z uporabo teh strategij spoprijemanja in ob podpori zaščitnih faktorjev lahko MS bolje obvladujejo stresne situacije ter ohranjajo svojo profesionalno učinkovitost in čustveno dobro počutje v zahtevnem okolju paliativne oskrbe.

Literatura

- 1 Adams M, Chase J, Doyle C, et al. Self-care planning supports clinical care: putting total care into practice. *Prog Palliat Care* 2020; 28(5): 305–307. doi:10.1080/09699260.2020.1799815.
- 2 De Brasi EL, Giannetta N, Ercolani S, et al. Nurses' moral distress in end-of-life care: A qualitative study. *Nurs Ethics*. 2021;28(5):614-627. doi:10.1177/0969733020964859.
- 3 Halifax J. G.R.A.C.E. For nurses: cultivating compassion in nurse/patient interactions. *J Nurs Educ Pract* 2013; 4: 209–228. doi: 10.5430/jnep.v4n1p121.
- 4 Sapeta P, Centeno C, Belar A, Arantzamendi M. Adaptation and continuous learning: integrative review of coping strategies of palliative care professionals. *Palliat Med*. 2022;36(1):15-29. doi:10.1177/02692163211047149.

Samoinjiciranje zdravila za zdravljenje ITP - našemu bolniku prijazna možnost

Tatjana Šopinger Lipovnik

Internistični ambulantni center, Klinika za interno medicino, Univerzitetni klinični center Maribor
tatjana.sopingerlipovnik@gmail.com,

Izvleček

Samoinjiciranje zdravila za ITP predstavlja pomemben korak v zdravstvenem procesu, ki omogoča bolnikom večjo samostojnost in udobje pri zdravljenju. Romiplostim se uporablja za zdravljenje primarne imunske trombocitopenije (ITP). Glavna prednost samoinjiciranja romiplostima je, možnost samostojne aplikacije, kar zmanjšuje potrebo po obiskih zdravstvenih ustanov in povečuje njihovo udobje ter samostojnost pri izvajanju zdravljenja. Čeprav lahko samoinjiciranje olajša življenje, je ključnega pomena ustrezna podpora zdravstvenega osebja. Pomembno vlogo pri vpeljavi samoinjiciranja zdravil igra predvsem dobra edukacija bolnikov.

Uvod

Primarna imunska trombocitopenija (ITP), nekoč imenovana idiopatska trombocitopenična purpura, je avtoimunska bolezen, ki nastane zaradi razpada trombocitov (Tr), ki ga povzročajo protitelesa in T-celični mehanizmi, ter zmanjšanega nastajanja trombocitov v kostnem mozgu. Incidenca v evropskih državah znaša 1–4 primeri na 100.000 prebivalcev in se povečuje s starostjo. Za postavitev diagnoze mora bolnik po mednarodnih smernicah imeti povsem normalno krvno sliko, razen zmanjšanega števila trombocitov, ki je manjše od $100 \times 10^9/L$, ter brez drugih vzrokov za to stanje in brez drugih bolezni, ki bi lahko povzročile sekundarno imunsko trombocitopenijo.

Zdravljenje ITP skozi čas

Zdravljenje ITP skozi čas se je spreminjalo in prilagajalo glede na razpoložljive metode. Na začetku so se pogosto uporabljale transfuzije trombocitov, ki so sicer zagotavljale začasno povečanje

števila trombocitov, vendar je bil učinek zaradi razpoložljivosti trombocitov in kratkega trajanja učinkovitosti omejen. Kortikosteroidi so postali uveljavljen pristop, ki se je izkazal za učinkovitega pri zmanjševanju vnetnega odziva in preprečevanju neželenih aktivnosti imunskega sistema. Kljub temu, da so še vedno terapija prve izbire in so v večini primerov učinkoviti v nekaj dneh, se pogosto pojavi potreba po ponovljenem zdravljenju, kar vzbuja skrbi glede dolgoročnih neželenih učinkov.

Med standardnimi oblikami zdravljenja se uporabljajo tudi intravenski imunoglobulini (IVIg) in anti-D imunoglobulin, vendar nobena od standardnih oblik ni priporočljiva za dolgotrajno uporabo zaradi pomanjkanja zdravilnih učinkov, visokih stroškov in zapletov, povezanih z zdravlili.

Splenektomija, je ena od bolj invazivnih možnosti zdravljenja, ki lahko prinese olajšanje bolnikom, saj je vranica ključna pri uničevanju trombocitov. Čeprav se je njena uporaba v zadnjem desetletju močno zmanjšala, ostaja učinkovita kurativna možnost pri bolnikih, ki se ne odzivajo na druge terapije.

Agonist trombopoetinskih receptorjev

V preteklih dveh desetletjih je prišlo do pomembnega napredka v razvoju zdravil za zdravljenje ITP. V uporabo so se začeli uvajati agonisti trombopoetinskih receptorjev, kot je romiplostim, ki predstavlja popolnoma drugačen pristop k zdravljenju ITP.

Romiplostim se uporablja pri pediatričnih bolnikih, starejših od enega leta, s kronično ITP, ki niso odzivni na vsaj eno drugo zdravljenje ali za zdravljenje ITP pri odraslih bolnikih, ki se niso ustrezno odzvali na druga zdravila. To zdravilo, ki posnema naravne procese tvorbe trombocitov v telesu, povečuje njihovo število in s tem zmanjšuje tveganje za krvavitev.

Začetni odmerek romiplostima je 1 µg/kg glede na dejansko telesno maso. Količina za apliciranje se izračuna na podlagi telesne mase, zahtevanega odmerka in koncentracije zdravila. Po pripravi praška je treba raztopino za injiciranje romiplostima aplicirati subkutano. Količina za injiciranje je lahko zelo majhna. Med pripravo romiplostima, je potrebna previdnost pri izračunu odmerka in

pripravi s pravilno količino sterilne vode za injekcije. Pediatrični bolniki si zdravila ne smejo aplicirati sami.

Izbira in usposabljanje odraslih bolnikov za samoinjiciranje zdravila

Da si lahko bolnik sam ali oseba, ki skrbi zanj, aplicira romiplostim, je potreben:

1. Interes

Bolnik ali skrbnik mora biti primeren in sposoben za injiciranje zdravila. Od njega se pričakuje, da za injiciranje ne bo potreboval prisotnosti ali pomoči zdravstvenega delavca.

Bolnik je lahko primeren kandidat za injiciranje romiplostima le, če se izkaže:

- da je sposoben upoštevati navodila,
- da zmore pravilno obvladati vse potrebne korake injiciranja,
- da nima telesne bolezni ali motnje, ki bi mu preprečevala natančno pripravo in injiciranje zdravila.

2. Stabilen odmerek romiplostima

Stabilen odmerek zdravila za namen injiciranja pomeni, da bolnikovega odmerka zdravila ni bilo potrebno prilagoditi vsaj 4 tedne (število trombocitov $\geq 50 \times 10^9/L$).

Bolniki, ki potrebujejo prilagoditve odmerka, si lahko začnejo zdravilo ponovno samoinjicirati šele, ko se jim odmerek stabilizira. To pomeni potem, ko odmerka zdravila ni bilo potrebno prilagoditi vsaj 4 tedne.

3. Pripravljenost za sodelovati pri usposabljanju

Bolnik (ali oseba, ki zanj skrbi) mora opraviti usposabljanje o pripravi in injiciranju zdravila.

Bolnik (ali oseba, ki zanj skrbi) se zaveže, da bo opravil usposabljanje in razum, da zdravila ne bo smel injicirati, vse dokler ne dokaže, da je tega sposoben.

Izobraževalno gradivo

Bolnik prejme izobraževalno gradivo, ki je pripravljeno z namenom zagotavljanja varne in učinkovite uporabe zdravila ter ustreznega obvladovanja določenih pomembnih tveganj in je odobreno s strani JAZMP (april 2019). Ta vodnik je namenjen vsem odraslim bolnikom, ki so se odločili za samoinjiciranje romiplostima. Gradiva v tem kompletu za usposabljanje bolnikov pri samoinjiciranju romiplostima jim pomagajo pri uspešnem injiciranju zdravila doma.

Usposabljanje za samoinjiciranje zdravila

Preden bolnik začne zdravilo injicirati doma, mora biti prepričan o svojem znanju glede priprave in injiciranja tedenskega odmerka zdravila. Čeprav je usposabljanje sestavljeno iz štirih korakov, bolniki potrebujejo različno dolgo, da se naučijo zdravilo pripraviti in injicirati. Najpomembnejše je, da je bolnik po zaključku usposabljanja samozavesten in da se počuti usposobljen za pripravo in injiciranje zdravila brez neposrednega nadzora zdravstvenega delavca.

Pri učinkovitem zdravljenju z biološkim zdravilom romiplostim je ključnega pomena aktivno sodelovanje in dobra informiranost bolnika. Pomembno vlogo pri pripravi bolnika na sodelovanje v terapevtskem procesu igra medicinska sestra. Poseben poudarek je namenjen zdravstveni vzgoji bolnika in zagotavljanju podpore s strani medicinske sestre. Najpogostejša ovira pri uvajanju samoinjiciranja biološkega zdravila so različni strahovi in težave s tehniko aplikacije, zato je ključno odpraviti te težave in strahove ter ustrezno pripraviti bolnika.

V tem procesu ima pomembno vlogo medicinska sestra, ki izvaja različne naloge, kot so psihološka priprava bolnika na samoinjiciranje, spodbujanje k izražanju vprašanj, strahov in zadržkov. Prav tako skrbi za edukacijo samoinjiciranja, korak za korakom, s pomočjo ponazoritve in razlage, ter zagotavlja pomoč v vseh fazah postopka, pri čemer ocenjuje in evidentira izvedene postopke.

Izjemnega pomena pri pripravi bolnika na samoinjiciranje biološkega zdravila sta uvajanje v samoinjiciranje in izobraževanje, pri čemer ima ključno vlogo medicinska sestra. Pri tem si medicinska sestra pomaga s kompleti gradiv za pripravo in samoinjiciranje romiplostima.

Zaključek

Dobra edukacija bolnikov je ključna za uspešno samoinjiciranje pri zdravljenju ITP. Medicinske sestre igrajo pomembno vlogo pri pripravi bolnikov na samoinjiciranje, ter zagotavljanju strokovne podpore in navodil v procesu usposabljanja. S pravilnim pristopom k izobraževanju in podpori lahko bolniki dosežejo večjo samostojnost pri upravljanju svojega zdravljenja in izboljšajo kakovost življenja.

Literatura

4. Provan D, Stasi R, Newland AC, Blanchette VS, Bolton- Mags P, Bussel JB, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2011; 115: 168–86.
5. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009; 113: 2386–93.
6. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Nplate. Dostopano 27.2.2024 na https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/nplate-epar-product-information_sl.pdf. Pridobljeno iz <https://www.jazmp.si/dokumenti/>.
7. Šopinger L T; Lešnik A. Evolucija zdravljenja primarne imunske trombocitopenije. *Utrip*. 2024; 16.

Spolnost kot pomemben dejavnik kvalitete življenja pri bolnikih po presaditvi krvotvornih matičnih celic

Polona Rihtaršič

Splošna bolnišnica Slovenj Gradec

polonca.rihtarsic@sb-sg.si

Spolnost ni dejanje, ampak je naša podoba in osebnost. Spolnost opisuje akt, ki je le del celotne komunikacije med dvema osebam. Rezultat spolnega akta je vrhunec, opisan kot orgazem. Problemi v človeški spolnosti niso nič bolj ali manj pomembni od vseh drugih bolezni. Zato bi moralo biti svetovanje s področja spolnosti običajna praksa.

Spolnost na vseh področjih življenja še vedno predstavlja tabu temo, prav tako tudi v zdravstvu. Ko se bolniki skupaj z zdravstvenimi delavci borimo proti raznovrstnim boleznim, se ves trud pogosto usmerja v zdravljenje bolezni, premalo pa se razmišlja o kakovosti življenja bolnikov. V prvi vrsti gledamo na preživetje, ko pa le-to ni več ogroženo, bi morali gledati širše.

Presaditev krvotvornih matičnih celic povzroči telesne spremembe, ki povzročajo težave na področju spolnosti.

Najpogostejše spremembe, ki lahko vplivajo na spolnost pri ženskah, so: izguba menstruacije zaradi zdravljenja, izguba želje po spolnosti, suha vaginalna sluznica, sindrom menopavze, boleči spolni odnosi ter nedoživljanje orgazma.

Pri moških sta najpogostejši težavi impotenca ter nezmožnost ejakulacije. Glede zadovoljstva pri spolni dejavnosti, doživljanja orgazma ter pogostosti spolnih odnosov je po presaditvi krvotvornih matičnih celic (PKMC) raven veliko nižja v primerjavi z obdobjem pred PKMC. Na lestvici od 1 do 10 (10 pomeni zelo sem zadovoljen/a, 1 pomeni sploh nisem zadovoljen/a) je stopnja zadovoljstva 5,91.

Psihološka stiska, ki jo bolniki doživljajo po PKMC, se začne s trenutkom postavitve diagnoze in traja skozi celotno zdravljenje ter se nadaljuje skozi celotno življenje po presaditvi. Zajema zaskrbljenost, jezo, depresijo, žalovanje za izgubo plodnosti, strah pred ponovitvijo bolezni, ranljivost, zmanjšano samozavest in spremembe v telesni podobi. Tovrstna stiska ima pomemben in dolgotrajen vpliv na spolno dejavnost. Spolnost je namreč zapleteno sovplivanje psiholoških, fizioloških in socialnih dejavnikov, zato težav v spolnosti ne moremo proučevati samo iz enega zornega kota.

Življenjska doba bolnikov po PKMC se iz leta v leto podaljšuje. Gledano v svetovnem merilu je letno opravljenih 45.000 PKMC. Povečalo se je tudi število raziskav, ki se ukvarjajo s poznimi učinki presaditve. Večina je osredotočenih na medicinske probleme, le redke se ukvarjajo z dnevnimi težavami, ki pestijo bolnike.

Pogosto mislimo, da bo spolnost zadnja misel v obdobju zdravljenja, vendar ne bi smelo biti tako. Intimnost lahko zviša raven samopodobe, zato bolnik in partner ostaneta povezana tudi skozi težja obdobja zdravljenja. Zdravljenje pogosto povzroči neprijetna čustva neprivlačnosti zaradi izgube las ter izgube ali pridobitve telesne teže. Veliko psihologov se strinja, da ima vzdrževanje normalnega spolnega življenja veliko prednosti v obdobju zdravljenja onkološke bolezni.

V svojem magistrskem delu sem se ukvarjala z vprašanjem, kako PKMC vpliva na spolnost pri bolnikih. Rezultati so bili zanimivi in skupno jim je bilo to, da se moramo o spolnosti po PKMC več pogovarjati in tako zmanjšati občutek sramu, saj je približno polovica udeležencev raziskave navedla, da so po PKMC še vedno spolno dejavni. Tudi bolniki sami so v raziskavi izrazili željo po večji seznanjenosti, dodatnih nasvetih in verodostojni literaturi, ki bi jih usmerjala na prehodu iz sterilnega bolnišničnega okolja v domačo oskrbo.

Spolnost je ena od temeljnih človekovih življenjskih dejavnosti, zato težave na tem področju vplivajo tudi na kakovost življenja, ki je po pričakovanjih nižja kot pred PKMC glede na našo raziskavo. Skoraj polovica udeležencev raziskave je kakovost življenja po PKMC ocenila s 3,3, v primerjavi z oceno 5, ki bi pomenila enako kakovost kot pred PKMC.

Bolniki po PKMC so premalo informirani o različnih pripomočkih in zdravilih, ki so dostopni na trgu za ublažitev in zmanjšanje težav pri spolni dejavnosti. Le dva preiskovanca iz raziskave jemljeta zdravilo sildenafil, ker imata po PKMC hude in pogoste težave na področju erektilne disfunkcije. Nekatere ženske uporabljajo vaginalne dilatatorje za zmanjšanje zožitve in občutljivosti med penetracijo. V skrajnih primerih ženske z zožitvijo nožnice potrebujejo operacijo. Moški lahko uporabijo tudi zunanje vakuumske naprave ali vsadke za penis, vendar se jih zelo malo odloči za te načine.

Spolne rehabilitacije pri nas ne poznamo, je pa vsaj tako obsežna kot vsaka druga rehabilitacija in naj obsega:

- medicinsko pomoč pri spolnih motnjah (medikamentozna, kirurška),
- psihoterapijo (pogovori z lečečim zdravnikom, psihoterapevtom),
- samopomoč (naučiti se sprejemati telesne spremembe, razvijati nove oblike spolnega zadovoljevanja, pogovori s partnerjem).

Pomembno je, da bi se svetovanju o spolnosti po bolezni pridružil tudi bolnikov partner. Tako bi bolje razumel, kaj se dogaja z njegovo ljubljeno osebo. V anketi je ena od preiskovank napisala, da je razmišljala celo o ločitvi, saj partner ni razumel, zakaj ji ni do spolnosti in kaj se z njo dogaja. Partner ima pri vzpostavljanju intimnosti pomembno vlogo. Izkušnja onkološke bolezni predstavlja velik stres in prizadetost tudi pri njem. Partner bi moral biti vključen v seznanjanje o sami bolezni ter zdravljenju in nepričakovanih posledicah. Večina parov tudi po PKMC spi skupaj v isti postelji, kar je pomemben dejavnik pri vzpostavljanju ponovne vezi med partnerjema na področju spolnosti. Večina udeležencev raziskave je v obdobju anketiranja že imela otroke, vendar je treba izpostaviti pomembnost vprašanja plodnosti po PKMC, še preden se bolnik začne pripravljati na presaditev z intenzivnimi postopki, ki lahko zmanjšajo stopnjo plodnosti. V primeru, da posameznik želi postati starš po PKMC, obstaja način kondicioniranja spolnih celic, vendar ta možnost ni vedno na razpolago. Z bolnicami se je potrebno pogovoriti o možnih oblikah zanositve

ter o možnosti prezgodnje menopavze. Ohranjanje rodnosti po PKMC ima lahko pomemben vpliv na kakovost življenja preživelih po PKMC.

Ključ za rešitev tovrstnih dilem in težav je v pogovoru in seznanjanju ter odkrita razgrnitev tudi te problematike. Bolnikom odkrit pogovor in posredovanje literature, za katero vedo, da ji lahko zaupajo, veliko pomeni. S takim načinom dela bomo rešili marsikateri partnerski odnos in izboljšali kakovost življenja, ki si jo zasluži vsak bolnik, ki je prestal dolgotrajno zdravljenje hematološkega obolenja, vključno s PKMC.

Beseda bolnik je uporabljena nevtrarno za oba spola.

Literatura:

1. Chernenkoff W (1974). Human sexuality: a challenge to family physicians. *Cam Fam Physician* 20(8): 49–52.
2. Fayed L (2010). The sexual side effects of chemotherapy. Dostopno na: <http://cancer.about.com/od/chemotherapy/a/sexsideffects.html> <30. 5. 2013>.
3. Fras AP (2001). Rak in spolnost. Dostopno na: <http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/2-2001-fras.pdf> <30. 5. 2013>.
4. Lee H, Park EY, Kim HM, Kim K, Kim WS, Yoon SS, Kang WK, Park KC, Park CH (2002). Sexuality and quality of life after hematopoietic stem cell transplantation. *Korean J Intern Med* 17(1): 19–23.
5. Socie G (2008). Sexuality in long-term survivors. *Blood* 111(3): 972–3.
6. Tierney KD (2008). Sexuality: A quality-of-life issue for cancer survivors. *Seminars in Oncology Nursing* 24: 71–79.

Glasbena terapija

Mihaela Kavčič

Klinični oddelek za otroško hematologijo in onkologijo, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana

Kavcic.mihaela@gmail.com

Povzetek:

Glasbena terapija je strokovna praksa, ki jo izvajajo strokovno usposobljeni glasbeni terapevti kot samostojno prakso v različnih okoljih, tudi znotraj zdravstvenega sistema. Gre za ne-farmakološko terapevtsko obravnavo, da bi z njo zadovoljili psihološke, fizične, čustvene, socialne in duhovne potrebe klientov¹. V tem procesu gre za medsebojni preplet odnosov in ustvarjanja med terapevtom, klientom in glasbo.

Svetovno združenje za glasbeno terapijo je glasbeno terapijo opredelilo kot »**profesionalno uporabo glasbe** in glasbenih elementov v zdravstvenem, izobraževalnem in vsakodnevem okolju, s posamezniki, skupinami, družinami ali skupnostmi, ki stremijo k izboljšanju dobrega počutja, kakovosti življenja in zdravja na fizičnem, socialnem, čustvenem, intelektualnem, komunikacijskem in duhovnem področju. Znanstvene raziskave, terapevtsko delo, izobraževanje in študijska praksa v glasbeni terapiji temeljijo na poklicnih standardih, v skladu s kulturnim, socialnim in političnim okoljem« (Kern, 2011, odst. 3).

V Sloveniji je najbolj razširjena opredelitev glasbene terapije, kot jo zapiše vodja študija glasbene terapije na Inštitutu Knoll, Špela Loti Knoll: »Glasbena terapija je strokovna praksa, v kateri ima osrednjo vlogo trosmerni proces med terapevtom, klientom¹ in glasbo. Uporaba glasbe nudi klientom varen komunikacijski prostor, kjer se lahko srečajo s svojo stisko, jo izrazijo, preoblikujejo in ozdravijo.« (Š. L. Knoll, 2006, str. 36)

Glasbena terapija ima v tujini že večdesetletno tradicijo, ponekod tudi urejeno zakonodajo, v Sloveniji pa še ni uveljavljena kot samostojna stroka v zdravstvu (kot je to npr. v sosednji Avstriji) niti ne kot poklic. Za poklicno priznanje si prizadevamo v Združenju glasbenih terapevtov Slovenije.

Znanstveni, umetniški in ustvarjalni elementi kažejo na raznolikost te strokovne discipline. Gre za ustvarjalni proces, v katerem imajo velik pomen igra, domišljija in prosta improvizacija, ki se med drugim izraža tudi v drži terapevta. Glasba kot umetnostni medij je pomemben element glasbenoterapevtske obravnave. Terapevt mora imeti razvite glasbene sposobnosti in ustrezno glasbeno izobrazbo. Pojem znanstveno se navezuje na naraščajoče število empiričnih študij o učinkovitosti glasbene terapije v različnih kliničnih in nekliničnih okoljih, kjer se glasbena terapija dejansko že uporablja. Glasba kot izrazno sredstvo in glasbena terapija kot disciplina, ki širi možnost izražanja, lahko v primerjavi z verbalnimi oblikami terapije doseže bistveno širšo ciljno populacijo (Knabe, 2023, str. 5). Glasbeno terapijo tako najdemo v raznolikih kontekstih, v slovenskem prostoru predvsem na področju socialnega varstva, zdravstva ter vzgoje in izobraževanja.

Stegemann idr. (2019, v Knabe, 2023, str. 6) razločujejo med glasbeno terapijo in podobnimi oblikami uporabe glasbe v medicinske namene, pojasnjujejo, kaj glasbena terapija ni in predlagajo razdelitev na tri področja: glasbena medicina (Music medicine), glasbena terapija (Music therapy) in druge intervencije z glasbo (other music-based interventions). Razlikujejo se predvsem po tem, kdo jih izvaja in kaj se počne. Pri glasbeni medicini gre v prvi vrsti za poslušanje vnaprej posnete glasbe z namenom spodbujanja zdravja. Glasbo predvajajo zdravstveni delavci, npr. za lajšanje bolečin med operacijo, za sproščanje in podobno. Kot druge intervencije z glasbo so povzete glasbene dejavnosti, ki spodbujajo zdravstvene in rekreativne cilje in jih izvajajo zdravstveni delavci, glasbeniki ali druge osebe. To so na primer glasbeni dogodki in koncerti v ustanovah, različne instrumentalne in pevske skupine, zbori, meditacije s pojočimi skledami ali gongi, t. i. zvočne kopeli in podobno. Za razliko od tega je glasbena terapija jasno opredeljena kot sistematična uporaba različnih metod posebej prilagojenih glasbenih doživetij znotraj terapevtskega odnosa za krepitev zdravja. Glasbeno terapijo sme izvajati izključno usposobljeni glasbeni terapevt.

V Sloveniji je glasbena terapija, ki jo izvaja usposobljeni glasbeni terapevt, na področju zdravstva najdlje uveljavljena na Pediatrični kliniki, na oddelku na otroško hematologijo in onkologijo. Redne glasbenoterapevtske obravnave otrok in mladostnikov organizira in finančno podpira društvo staršev otrok, obolelih za rakom, »Junaki 3. nadstropja.«

Metode, oblike, tehnike

Glasbena terapija je stroka, ki se še vedno razvija, sledi novim izzivom, ki jih prinašajo družba, okolje, tempo življenja in išče skupno terminologijo širom sveta. V strokovni literaturi najdemo številna poimenovanja, ki opisujejo metode, oblike, tehnike v glasbeni terapiji. Glasbena terapija je samostojna disciplina, ki sloni na različnih pristopih; glede na to, katera smer je bila temelj razvoja. Tako poznamo nevrološko, psihodinamsko, ustvarjalno, družbeno usmerjeno glasbeno terapijo. V praksi uporabljamo različne metode in oblike dela ter različne intervencije.

Pri oblikah razlikujemo med aktivno in receptivno obliko glasbene terapije. Pri aktivni obliki gre za aktivno vključenost klienta; z igranjem na (preprosta) glasbila, vokaliziranjem, petjem, aktivnim poslušanjem, ustvarjanjem. V ospredju je skupno muziciranje s terapevtom. Receptivna oblika se osredotoča na poslušanje glasbe, pri čemer klient ni glasbeno dejaven.

V proces je lahko vključen en klient, v tem primeru govorimo o individualni terapiji, lahko pa je vključenih več oseb, kar imenujemo skupinska (glasbena) terapija. Običajno je skupina manjša (do 6 oseb).

Ne moremo mimo dejstva, da je - ne glede na uporabo določene oblike, metode ali intervencije - v ospredju glasbenoterapevtskega procesa vselej odnos med terapevtom in klientom. Terapevt s svojo terapevtsko držo podpore in sočutja ustvarja prostor zaupanja in varnosti, znotraj katerega se klient lahko izraža.

Namen glasbene terapije v onkologiji je zagotoviti psihosocialno podporo pacientom z rakom in njihovim svojcem pri spoprijemanju z zdravljenjem in spopadanju z boleznijo. Pomemben cilj je

ohranitev ali ponovna pridobitev kakovosti življenja ter usmeritev na vire moči, v primeru težkega poteka bolezni pa tudi oskrba ob koncu življenja (Knabe, 2023, str. 45).

Na hematoonkološkem oddelku Pediatrične klinike glasbena terapija večinoma poteka kot individualna terapija, običajno v sobi bolnika. Vrsta in trajanje glasbenoterapevtskih srečanj sta odvisna od postopka bolnišničnega zdravljenja in fizičnega stanja bolnikov. Glede na individualne potrebe bolnikov se uporabljajo predvsem metode, ki spodbujajo sproščanje, preusmerjanje pozornosti in spodbujanje virov moči.

V pediatrični onkologiji so še posebej pomembni igralni elementi in izkušnja normalizacije, ki jo omogoča glasbena terapija. Pri tem imata poseben pomen tudi razbremenitev staršev oz. skrbnikov in možnost vzajemne izkušnje vesele igre v sicer utesnjujočem okolju pediatričnega onkološkega oddelka. V glasbenih improvizacijah, ki jih vodi otrok, je mogoče vsaj na trenutke ublažiti sicer veliko izgubo nadzora (Knabe, 2023, str. 46). Sistematični pregled študij o glasbeni terapiji v pediatrični onkologiji, ki so ga opravili (da Silva Santa idr., 2021) izpostavi zlasti dva učinka: zmanjšanje bolečine in anksioznosti.

Zaključek:

Glasbena terapija je pomembna podporna terapija v procesu zdravljenja. Prizadevamo si, da bi bil glasbeni terapevt del širšega tima. Dragoceno je namreč deliti informacije, odzive, tudi dileme, da bi vsi strokovnjaki bolnikom lahko omogočili čimbolj učinkovito podporo. Nenazadnje pa je tovrstna terapija tudi nežna spremljevalka v času paliativne oskrbe.

¹ V strokovni literaturi najdemo različna poimenovanja za osebe, ki so vključene v terapijo. V nemškem okolju uporabljajo besedo pacient, v angleškem klient. V slovenski glasbenoterapevtski stroki smo se odločili za rabo besede klient.

Literatura:

1. da Silva Santa, I. N., Schweitzer, M. C., dos Santos, M. L. B. M., Ghelman, R., & Filho, V. O. (2021). Music interventions in pediatric oncology: Systematic review and meta-analysis. *Complementary Therapies in Medicine*, 59, 102725. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2021.102725>
2. Kern, P. (2011). *Announcing WFMT's NEW Definition of Music Therapy*. <https://wfmt.info/2011/05/01/announcing-wfmets-new-definition-of-music-therapy/>
3. Kavčič, M. (2019). *Up: Glasbena terapija z osebami z demenco*. Ad libitum, društvo za glasbeno terapijo.
4. Knabe, C. (2023). *Pomen funkcionalnih in psihoterapevtskih pristopov v glasbeni terapiji z osebami s težkimi motnjami v razvoju*. [Doktorska disertacija]. Ljubljana
5. Knoll, Š. L. (2006). Otroci s posebnimi potrebami skozi oči glasbene terapije. V B. Založnik (ur.). *Otroci s posebnimi potrebami: Integracija in inkluzija* (str. 35 – 45). Educa.
6. Weymann, E. (2021). Improvisation. V E. Weymann & H. H. Decker-Voigt (ur.), *Lexikon Musiktherapie* (3. izd.). Hogrefe.

Imunohematologija (ZTMS)

Trombocitna protitelesa pri imunski trombocitopeniji

Primož Rožman, Maja Grundner

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

primoz.rozman@ztm.si

Imunska trombocitopenija (ITP) je avtoimunska bolezen, za katero je značilno zmanjšano število trombocitov (Tr) ($< 100 \times 10^9/L$) in s tem povezano povečano tveganje za krvavitve. Bolezen je posledica imunske razgradnje sicer zdravih Tr, hkrati pa je lahko posledica zmanjšane nastajanja Tr iz megakariocitov v kostnem mozgu (KM). Nastane lahko spontano, po virusnih okužbah, pri kroničnih okužbah (npr. *Helicobacter pylori*, virus HIV, virus HCV), malignih obolenjih (npr. adenokarcinom, limfom), drugih avtoimunskih boleznih (npr. sistemski eritematozni lupus, avtoimunski hepatitis, boleznj ščitnice, itd.) ter po uporabi številnih zdravil.

Za nastanek ITP so odgovorna avtoprotitelesa (aPt), ki so ponavadi razreda IgG in so največkrat usmerjena proti glikoproteinom oz. glikoproteinskim kompleksom GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V, GPIa/IIa, GPIV ali GPVI na membrani Tr. Trombociti, na katerih so vezana aPt, postanejo razpoznavni za fagocitno razgradnjo v vranici in ledvicah, ista aPt pa lahko sprožijo tudi s komplementom posredovano lizo Tr preko klasične poti aktivacije komplementa. Trombocitna aPt se lahko vežejo tudi na megakariocite v KM, ki prav tako izražajo GPIb in GPIIb/IIIa, ter s tem preprečijo nastajanje novih Tr. Možen je tudi zaviralen vpliv aPt na adhezijo in migracijo megakariocitov, nekatera aPt pa imajo tudi specifičnost proti trombopoetinskemu receptorju, in na ta način zavirajo megakariopoezo.

Za postavitev diagnoze ITP se v praksi še vedno večinoma uporablja načelo izključevanja, po katerem najprej izključimo vse ostale možne vzroke trombocitopenije. Ključno je bolnikovo nizko število Tr ($< 100 \times 10^9/L$), za izključitev ostalih vzrokov pa so pomembni zdravstvena zgodovina bolnika, družinska anamneza, klinični pregled, pregled celotne krvne slike, mikroskopski pregled razmaza periferne venske krvi ter izključitev sekundarnih vzrokov trombocitopenije (npr. levkemija, eritematozni lupus, druge sistemske bolezni veziva, bolezni jeter, kronične okužbe, HIV, itd). Veliko študij omenja, da zanesljivost klinične diagnoze ITP po načelu izključevanja ni optimalna, ker obstaja več smiselnih preiskav, s katerimi potrdimo obstoj aPt, ki povzročajo ITP.

Pri sumu na ITP je najbolj smotrna začetna preiskava določitev trombocitnih protiteles (Pt) v krvi bolnika. Večina bolnikov ima namreč v 60-80 % aPt, ki so usmerjena proti glikoproteinu GPIIb/IIIa, v 50 % proti GPIb/IX/V, redkeje pa sta tarči tudi GPIa/IIa ali GPIV. Pri večini bolnikov z ITP so Pt usmerjena proti obema glikoproteinoma, GPIIb/IIIa in GPIb/IX/V, v 10-40 % pa le proti enemu izmed njih. Potrebno se je zavedati, da v 20-40 % primerov bolnikov aPt ne zaznamo, kar pa še izključi diagnoze ITP. Možnih razlogov za to je več, in sicer: *i)* da se pri nekaterih bolnikih Tr razgradijo s celično posredovano imunostjo; *ii)* da lahko zdravljenje ITP zniža nivo aPt pod zaznavno mejo; *iii)* da je pri direktnem testu količina bolnikovih Tr premajhna; in *iv)* da včasih izbrani test ne omogoča zanesljive diagnostike in moramo najti alternativno metodo. Pri tem je po naših izkušnjah posebej potrebno upoštevati razmerje med vezanimi in prostimi trombocitnimi Pt, ki je posledica afinitete ter klonalne narave trombocitnih Pt, zaradi česar lahko prihaja do paradoksnih rezultatov različnih testov in težav pri interpretaciji rezultatov.

Za določanje Pt obstaja več metod, kot so imunofluorescenčna preiskava (angl. platelet immunofluorescence test – PIFT), pretočna citometrija, masna citometrija, razne vrste encimskih imunskih preiskav (ELISA), radioimunski test, imobilizacijska preiskava z monoklonskimi Pt (angl.

monoclonal antibody immobilization of platelet antigens – MAIPA), preiskava Luminex in še nekatere druge. V laboratoriju za trombocitne preiskave na Zavodu RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani rutinsko izvajamo teste PIFT, ELISA in kemiluminiscenčni test Luminex.

Preiskava PIFT je presejalni test, s katerim določamo bodisi trombocitna Pt v serumu ali plazmi (indirektni test), ali pa Pt, ki so vezana na Tr (direktni test). Za izvedbo indirektne testa je potreben panel štirih testnih Tr, ki jih izoliramo iz vzorcev krvi prostovoljnih dajalcev krvne skupine 0 in fiksiramo s formaldehidom, ter pozitivna in negativna kontrola (standardna seruma s prisotnimi oziroma odsotnimi trombocitnimi Pt). Za izvedbo direktnega testa potrebujemo tudi fiksirane Tr bolnika, za izolacijo katerih potrebujemo zadostno količino bolnikove krvi. Pozitiven rezultat preiskave PIFT predstavljajo kompleksi med bolnikovimi Pt na membrani Tr in s fluorokromom označenimi sekundarnimi Pt, katere zaznamo z uporabo fluorescenčnega mikroskopa. Preiskava je občutljiva (> 90 %), vendar ne omogoča identifikacije in zaznavanja Pt v nizkem titru ali z nizko avidnostjo. Potrebno se je zavedati, da je lahko direktni test lažno negativen, kot tudi lažno pozitiven. Slednje se zgodi v primeru nespecifične vezave Pt na ubikvitarne Tr antigene, kar je opazno predvsem pri bolnikih z limfomi, trombotično trombocitopenično purpuro, levkemijo, preeklampsijo, sistemskim lupus eritematosusom in drugimi sistemskimi avtoimunskimi boleznimi. S testom PIFT zaznamo TrPt samo pri okoli 70-80 % bolnikov z ITP. Zaznavanje prostih trombocitnih aPt je namreč lahko težavno zaradi dejstva, da tako nastajanje Pt, nato opsonizacija Tr ter na koncu njihovo odstranjevanje poteka lokalno v vranici in so zato lahko prosta Pt v periferni krvi manj zaznavna.

Dobro specifičnost in občutljivost pri zaznavi Pt omogoča napredni kemiluminiscenčni test Luminex, ki temelji na principu zaznave bolnikovih Pt, vezanih na mikrosfere z znanimi antigeni. Njegova prednost je predvsem v tem, da je analiza hitrejša in enostavnejša od ostalih metod ter da lahko s t. i. multipleks metodo določimo veliko število imunskih reakcij v enem samem vzorcu (**Slika 1**). Metoda omogoča tudi dodatne obdelave vzorca (npr. toplotna inaktivacija, redčitve

vzorca, itd.), s katerimi si pomagamo v zapletenih primerih, npr. pri interferenci s Pt anti-HLA, ki so prisotna pri velikem številu bolnikov.

PAK Lx SAMPLE ANALYSIS AND RESULTS				Batch Name:		Assay Date:		
PAK Lx Kit Lot #:			Assay Tech:			Analysis Date:		
SAMPLE ID:			Antibody Target	GPIV	HLA	GPIIbIIIa (HPA-1,-3,-4)	GPIbIX (HPA-2)	GPIaIIa (HPA-5)
Minimum Cutoff (MC). If the MFI of the Con beads is < MC, the Adjusted Ratios are calculated using MC.			153	Neg	Pos	Reactive	Neg	Neg
Bead Region	Glycoprotein Group	Antigen	MFI	Bead Reactivity	Adjusted Ratio 1	Adjusted Ratio 2	Adjusted Ratio 3	
13	Con1	Con1	233					
14	Con2	Con2	260					
18	Con3	Con3	299					
11	POS	POS	15243					
6	GPIV	GPIV	271	Negative	-1.66	-1.65	-1.92	
10	HLA Class I	HLA Class I	9429	Positive	37.96	33.86	29.15	
21	GPIIb-IIIa	HPA - 1a-3a-4a	11725	Positive	46.81	41.9	36.01	
22	GPIIb-IIIa	HPA - 1a-3b-4a	11124	Positive	43.99	39.4	33.68	
23	GPIIb-IIIa	HPA - 1b-3a-4a	208	Negative	-2.43	-2.24	-2.33	
24	GPIIb-IIIa	HPA - 1b-3b-4a	198	Negative	-2.59	-2.41	-2.48	
25	GPIIb-IIIa	HPA - 1ab-3ab-4a	7369	Positive	27.97	24.78	21.07	
26	GPIIb-IIIa	HPA - 1a-3ab-4b	11256	Positive	44.78	40.05	34.48	
27	GPIb/IX	HPA - 2a	151	Negative	-1.79	-1.64	-1.74	
28	GPIb/IX	HPA - 2a	105	Negative	-1.84	-1.63	-1.73	
29	GPIb/IX	HPA - 2ab	161	Negative	-1.97	-1.76	-1.79	
30	GPIb/IX	HPA - 2b	119	Negative	-1.98	-1.71	-1.93	
32	GPIb/IX	HPA - 2b	152	Negative	-1.57	-1.52	-1.48	
33	GPIa-IIa	HPA - 5a	168	Negative	-2.5	-2.28	-2.43	
42	GPIa-IIa	HPA - 5a	188	Negative	-2.29	-2.11	-2.38	
48	GPIa-IIa	HPA - 5ab	167	Negative	-2.32	-2.22	-2.35	
51	GPIa-IIa	HPA - 5b	129	Negative	-2.56	-2.35	-2.56	
54	GPIa-IIa	HPA - 5b	176	Negative	-2.42	-2.24	-2.41	
Tech/Supervisor/Physician/Lab Director :						Date:		

Slika 1. Rezultat Luminex preiskave trombocitnih protiteles

Slika prikazuje primer analize vzorca bolnika, pri katerem smo zaznali prisotnost Pt proti HLA-I ter HPA-1a.

Določitev prisotnosti in specifičnosti trombocitnih aPt je relativno cenena in hitra preiskava, ki bi morala biti vključena v začetno testiranje, saj pozitiven rezultat pomembno pripomore k določitvi nadaljnjih diagnostičnih postopkov in poteku zdravljenja. Poleg tega bi lahko bila Pt pomembna tudi pri diagnozi nekaterih redkih motenj strjevanja, zaznamo pa lahko tudi prisotnost trombocitnih Pt, odvisnih od zdravil, ki lahko povzročajo jatrogeno imunsko trombocitopenijo. Koristni učinek določitve TrPt pa je tudi dejstvo, da lahko omenjene preiskave opozorijo klinika na nastanek aloprotiteles razreda HLA-I pri bolnikih, ki so prejeli transfuzije Tr, s čimer lahko napovejo morebitno refraktarnost na transfuzije trombocitov v prihodnosti.

Literatura

1. Cines DB, Bussel JB, Liebman HA, Luning Prak ET. The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2009;113(26):6511-21.
2. Fogarty PF. Chronic immune thrombocytopenia in adults: epidemiology and clinical presentation. *Hematology/Oncology Clinics*. 2009;23(6):1213-21.
3. Găman M-A, Găman AM. Pathophysiology, diagnosis and treatment of immune thrombocytopenia. *International Journal of Medical Students*. 2017;5(1):32-6.
4. Cines DB, McMillan R. Management of adult idiopathic thrombocytopenic purpura. *Annu Rev Med*. 2005;56:425-42.
5. Hagenström H, Schlenke P, Hennig H, Kirchner H, Klüter H. Quantification of platelet-associated IgG for differential diagnosis of patients with thrombocytopenia. *Thrombosis and haemostasis*. 2000;84(11):779-83.
6. Porcelijn L, Schmidt DE, Oldert G, Hofstede-van Egmond S, Kapur R, Zwaginga JJ, et al. Evolution and utility of antiplatelet autoantibody testing in patients with immune thrombocytopenia. *Transfusion Medicine Reviews*. 2020;34(4):258-69.
7. Sachs UJ. Diagnosing immune thrombocytopenia. *Hämostaseologie*. 2019;39(03):250-

8. Vrbensky JR, Moore JE, Arnold DM, Smith JW, Kelton JG, Nazy I. The sensitivity and specificity of platelet autoantibody testing in immune thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis of a diagnostic test. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2019;17(5):787-94.

Transfuzijska obravnava variant RhD: prikaz primerov

Janja Mrak, Irena Bricl

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Šljajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

janja.mrak@ztm.si

Povzetek

Natančna določitev krvne skupine RhD je pomembna za prejemnike transfuzij, nosečnice in krvodajalce. Glede na fenotip RhD se odločamo ali naj prejemniki transfuzij prejmejo RhD negativne (RhD neg) ali RhD pozitivne (RhD poz) komponente krvi, ali nosečnice potrebujejo zaščito z imunoglobulinom (Ig) anti-D in ali lahko kri krvodajalca prejmejo RhD poz ali RhD neg prejemniki krvnih komponent. Antigen RhD rutinsko določamo s serološkimi metodami, v primeru nejasnih rezultatov uporabimo molekularno-biološke metode za določitev genotipa *RHD*. Posameznikov fenotip je lahko RhD poz, RhD neg ali varianta RhD (RhD var).

Srečujemo se tudi s primeri, ko preiskovancem sprva določimo krvno skupino kot RhD neg ali RhD poz, naknadno pa ugotovimo, da nosijo zapis za RhD var. Prve obravnavamo kot RhD neg posameznike, zato pri njih ni tveganja za nastanek anti-D. Drugi pa so zaradi zmotne obravnave – ne prejmejo zaščite z Ig anti-D ali prejmejo RhD poz transfuzijo – ogroženi za nastanek protiteles anti-D, ki lahko povzročijo hemolitično bolezen ploda in novorojenca in hemolitične transfuzijske reakcije.

V prispevku predstavimo štiri primere nosečnic: prvi je bila serološko določena krvna skupina RhD poz, molekularna analiza pa je pokazala, da je nosilka RhD var (*RHD*DCS1/2* ali *RHD*DV.02/07*), drugi je bila serološko določena krvna skupina RhD neg, molekularna analiza pa je pokazala, da je *RHD* v celoti prisoten, tretji in četrti smo z rutinskimi serološkimi metodami določili krvno skupino RhD neg, molekularna analiza pa je pokazala, da je prva nosilka šibkega D tip 1, pri drugi pa je prisotna ena izmed variant RhD (*RHD*01W.14* ali *RHD*01W.40* ali *RHD*01W.51* ali *RHD*44* (*RHD*DHQ*)).

Dostopnost genotipizacije *RHD* je omogočila uspešno razreševanje serološko šibkih RhD, osredotočiti pa bi se bilo treba na primere, pri katerih serološko ne gre za šibke RhD, vendar pri njih obstaja tveganje za nastanek protiteles anti-D.

Abstract

Accurate determination of RhD blood type is important for transfusion recipients, pregnant women and blood donors. Depending on the RhD phenotype, the decisions, whether transfusion recipient receive RhD negative (RhD neg) or RhD positive (RhD poz) blood components, whether pregnant women need prophylaxis with anti-D immunoglobulin (Ig), whether donor's blood is safe for RhD poz or RhD neg recipient, are made. RhD antigen is routinely determined by serological methods, in case of unclear results, molecular-biological methods to determine the *RHD* genotype are used. An individual's phenotype can be RhD poz, RhD neg or variant RhD (RhD var).

We also encounter cases where individual's RhD blood type is initially assigned as RhD neg or RhD poz, and subsequently found out that they are carriers of RhD var. The former are treated as RhD neg individuals so they are not at risk to develop anti-D antibodies. The latter are due to possible mistreatment – did not receive immunoprophylaxis with anti-D Ig, they received RhD poz transfusions – at risk to develop anti-D antibodies, which can cause haemolytic disease of the fetus and the newborn and hemolytic transfusion reactions.

Four cases of pregnant women are presented in the article: RhD blood type of the first was serologically determined as RhD poz, molecular analysis has shown that she is a carrier of RhD var (*RHD*DCS1/2* or *RHD*DV.02/07*), RhD blood type of the second was serologically determined as RhD neg, molecular analysis has shown that *RHD* is fully present, RhD blood type of the third and fourth were routinely serologically determined as RhD neg, molecular analysis has shown the first is a carrier of weak D type 1, the second one of the RhD var (*RHD*01W.14* or *RHD*01W.40* or *RHD*01W.51* or *RHD*44* (*RHD*DHQ*)).

The availability of genotyping *RHD* has enabled the successful resolution of serologically weak D cases. In the future we should focus on cases, where serologic determination of RhD antigens is not weak, but there is a risk to develop anti-D antibodies.

Uvod

Krvno skupinski sistem RhD je klinično zelo pomemben. Sestavlja ga 56 antigenov, ki jih kodirata dva gena, *RHD* in *RHCE* na 1. kromosomu. Glede na gen *RHD* je lahko posameznikov fenotip RhD poz, RhD neg ali pa gre za varianto D (RhD var). V populaciji belcev je RhD poz 85 %, v podsaharski Afriki 95 % ter v azijski več kot 99,5 % populacije. Osebe, ki so RhD neg, bodisi nimajo gena *RHD* (delecija gena), bodisi se ta zaradi različnih sprememb v genu ne izrazi. Za populacijo belcev je značilna delecija gena *RHD*, za populacijo črncev pa delecije, mutacije ali hibridni geni *RHD-CE-D*. RhD var razdelimo na šibke D, parcialne D in D^{el}. Za šibke oblike D je značilno, da na površini celic izražajo antigen RhD, ki ima izražene vse epitope, le njihovo število na površini eritrocitov je manjše. Zanje so značilne zamenjave aminokislin v transmembranskem ali citoplazemskem delu proteina RhD. Serološko šibka oblika RhD lahko nastane tudi kot posledica zaviralnega učinka *Cde* v trans-položaju. Za parcialne oblike D so značilne spremembe v aminokislinskem zaporedju, ki spremenijo zunajcelični del proteina RhD, ob tem pa imajo lahko na površini eritrocitov normalno ali znižano gostoto antigena RhD. Za D^{el} eritrocite je značilno, da imajo na svoji površini zelo nizko število antigena RhD, zato jih lahko zaznamo le s tehniko adsorpcije in elucije. Značilni so za populacije azijskega porekla. Frekvenca RhD var je odvisna od etnične pripadnosti. Za belce je značilno, da ima od 0,2 % do 1 % populacije prisotne alele *RHD*, ki kodirajo serološko šibko izražene oblike antigena RhD, 95 % izmed njih pa predstavljajo šibki D tip 1, 2 in 3, ki ob stiku z RhD poz eritrociti ne tvorijo protiteles anti-D in jih zato lahko obravnavamo kot RhD poz. Nosilce ostalih RhD var obravnavamo kot RhD neg, saj ne izražajo vseh epitopov in lahko ob stiku z RhD poz eritrociti tvorijo anti-D. Pogosta parcialna oblika D pri belcih je D kategorija VI, protitelesa anti-D, ki jih tvorijo DVI posamezniki pa so klinično pomembna, saj lahko povzročijo zelo hude oblike hemolitične bolezni ploda in novorojenčka (HBPN) in hemolitične transfuzijske reakcije (HTR).

Določanje antigena D

Za določitev antigena RhD uporabljamo serološke metode ali pa predvidimo njegovo prisotnost na podlagi molekularno-bioloških metod. Pri serološkem določanju uporabljamo različne poliklonske ali monoklonske reagente. Nosečnicam in prejemnikom transfuzij rutinsko določamo antigen RhD z monoklonskimi reagenti, ki ne zaznajo D kategorije VI, z namenom, da jih obravnavamo kot RhD neg. Krvodajalcem pa določamo antigen RhD z reagenti, ki zaznajo D kategorijo VI. Poleg tega pri vseh RhD neg krvodajalcih določimo antigen RhD tudi z dodatkom antihumanega globulina (AHG; test na šibek D). Tiste s pozitivnim rezultatom obravnavamo kot RhD poz, njihovo kri lahko prejmejo le RhD poz prejemniki. Poleg rutinskega določanja antigena RhD s testnimi sistemi z različnimi gelskimi karticami lahko uporabimo tudi komercialni set ID-PartialRhD Typing Set (Bio-Rad, Nemčija), ki vsebuje 6 monoklonskih anti-D, določamo RhD z metodo z indirektnim Coombsovim testom (ICT, ID Diaclon anti-D, Bio-Rad) ali z adsorpcijo in elucijo. S serološkimi metodami ne moremo ločiti med posameznimi RhD var, zato v nejasnih primerih uporabimo molekularno-biološke metode; verižna reakcija s polimerazo s sekvenčno specifičnim prileganjem (PCR-SSP, *angl.* Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Priming).

Prikaz primerov

Primer A: 29-letna nosečnica (2. nosečnost, 2. porod), pri kateri je ob porodu prišlo do raztrganja maternice, zato smo zanjo pod imenom A.T.S. prejeli naročilo za dve enoti koncentriranih eritrocitov (stopnja nujnosti: 1. faza po telefonu). Po protokolu smo ji določili krvno skupino A, RhD poz (orientacijsko na ploščici in v epruveti s komercialnim reagentom Seraclone anti-D). Po pregledu dokumentacije smo ugotovili, da je bila preiskovanka pri nas v preteklosti vodena pod imenom A.S. V prvi nosečnosti smo ji določili krvno skupino A, RhD neg, Du poz. Genotipizacija *RHD* je pokazala, da gre za *RHD* var, *parcialni RHD*DCS1/2* ali *RHD*DV.02/07* (PCR-SSP z uporabo komercialnih setov RBC-Ready Gene CDE, RBC-Ready Gene D weak and RBC-Ready Gene D AddOn,

Inno-Train; Nemčija). Glede na pretekle rezultate smo preiskovankin antigen RhD serološko opredelili s testnimi sistemi z različnimi gelskimi karticami (DG Gel ABO/Rh (2DVI-) in DG Gel Confirm P, Grifols) in s komercialnim setom s 6 monoklonskimi anti-D (ID-Partial RhD Typing Set, Bio-Rad, Nemčija). Reaktivnost z vsemi anti-D reagenti je bila močno pozitivna, ni bilo suma na RhD var. Glede na rezultat genotipizacije *RHD* smo preiskovankino krvno skupino določili kot A, RhD neg, Du poz, v primeru imunizirajočih dogodkov je indicirana zaščita z Ig anti-D, prejemati mora RhD neg komponente krvi.

Primer B: 25-letna nosečnica (1. nosečnost), ki smo ji v prvi tretjini nosečnosti določili krvno skupino A, RhD neg, indirektni Coombsov test (ICT) je bil negativen. V 25.-26. tednu nosečnosti v sklopu ciljane zaščite določitev plodovega genotipa *RHD* iz zunajcelične proste plodove DNA (zcp-DNA) ni bila mogoča, zato smo nadaljevali z genotipizacijo *RHD* matere. Rezultat je pokazal, da je *RHD* v celoti prisoten (PCR-SSP z uporabo komercialnih setov RBC-Ready Gene CDE, RBC-Ready Gene D weak and RBC-Ready Gene D AddOn, Inno-Train; Nemčija). S serološkim testiranjem s testnimi sistemi z različnimi gelskimi karticami (DiaClon ABO/D + Reverse Grouping, Bio-Rad, Nemčija), s komercialnim setom (ID-Partial RhD Typing Set, Bio-Rad, Nemčija), z določitvijo RhD z metodo ICT (ID Diaclon anti-D) in z adsorpcijo in elucijo na površini eritrocitov nismo zaznali antigena RhD. Glede na rezultate smo krvno skupino preiskovanke določili kot A, RhD neg. V primeru imunizirajočih dogodkov med nosečnostjo potrebuje injiciranje z Ig anti-D, prejemati mora RhD neg komponente krvi.

Primer C: 31-letna nosečnica (1. nosečnost), za katero smo v prvi tretjini nosečnosti prejeli vzorec krvi za določitev krvne skupine in ICT. Rezultati rutinskega serološkega testiranja za določitev antigena RhD na ploščici (komercialni reagent Seraclone anti-D) in na gelskih karticah (DiaClon ABO/D + Reverse Grouping, DiaClon ABO/Rh Confirmation for Patients, DiaClon ABO/Rh for Newborns DVI+, Bio-Rad, Nemčija) so pokazali, da je preiskovankina krvna skupina RhD neg. S komercialnim setom ID-PartialRhD Typing Set (Bio-Rad, Nemčija) in testom z metodo ICT (ID Diaclon anti-D) pa smo na površini eritrocitov zaznali antigen RhD. Preiskovanka je bila v preteklosti obravnavana kot krvodajalka, zaradi pozitivnega rezultata določitve RhD z dodatkom AHG, smo takrat nadaljevali z genotipizacijo *RHD*, ki je pokazala, da gre za šibek D tip 1. Zaradi

neobičajnih seroloških rezultatov smo ponovili genotipizacijo *RHD* (PCR-SSP z uporabo komercialnih setov RBC-Ready Gene CDE, RBC-Ready Gene D weak and RBC-Ready Gene D AddOn, Inno-Train; Nemčija), s katero smo potrdili, da gre za šibek D tip 1. Glede na serološko zelo šibko izraženo antigena RhD smo se odločili, da krvno skupino nosečnice določimo kot B, RhD neg, Du poz in priporočimo zaščito z Ig anti-D.

Primer D: 28-letna nosečnica (1. nosečnost), ki smo ji v prvi tretjini nosečnosti določili krvno skupino 0, RhD neg, ICT je bil negativen. V sklopu ciljane zaščite v 25.-26. tednu nosečnosti določitev plodovega genotipa *RHD* iz zcp-DNA ni bila mogoča. Nadaljevali smo z genotipizacijo *RHD* matere, ki je pokazala, da je prisotna ena izmed variant D: *RHD*01W.14* ali *RHD*01W.40* ali *RHD*01W.51* ali *RHD*44 (RHD*DHQ)* (RBC-Ready Gene CDE, RBC-Ready Gene D weak and RBC-Ready Gene D AddOn, Inno-Train; Nemčija). Z rutinskim serološkim testiranjem z različnimi gelskimi karticami (DiaClon ABO/D + Reverse Grouping, DiaClon ABO/Rh Confirmation for Patients, DiaClon ABO/Rh for Newborns DVI+, Bio-Rad, Nemčija, DG Gel ABO/Rh 2DVI- in DG Gel Confirm P, Grifols) na površini eritrocitov nismo zaznali antigena RhD, s komercialnim setom (ID-Partial RhD Typing Set, Bio-Rad, Nemčija) in s testom z metodo ICT (ID Diaclon anti-D) pa smo ga zaznali. Glede na rezultate rutinskega serološkega testiranja smo kljub prisotni RhD var krvno skupino preiskovanke določili kot 0, RhD neg. Priporočili smo zaščito z Ig anti-D.

Razprava

Prikazali smo primere nosečnic, pri katerih je določitev antigena RhD pomembno vplivala na nadaljnjo obravnavo. Pri nosilcih šibkega D tip 1, 2, 3 velja, da lahko prejemniki transfuzij prejmejo RhD poz komponente krvi, nosečnice ne potrebujejo zaščite z Ig anti-D. V kolikor gre za katerokoli drugo RhD var, smejo prejemniki transfuzij prejeti le RhD neg komponente krvi, nosečnice pa potrebujejo zaščito z Ig anti-D. Glede na priporočila Ameriškega združenja krvnih bank (*angl.*

American Association of Blood Banks, sedaj Association for the Advancement of Blood & Biotherapies, AABB) se lahko varno kot RhD poz obravnava tudi šibek D tip 4.1. Krvodajalce s katerokoli varianto RhD pa obravnavamo kot RhD poz, njihove krvne komponente lahko prejmejo le RhD poz prejemniki.

Znano je, da se parcialne oblike *RHD* serološko pogosto kažejo kot RhD poz. Tako je v prvem primeru preiskovanka, z v preteklosti pod drugim imenom določenim parcialnim *RHD*DCS1/2* ali *RHD*DV.02/07*, ki smo ji ob naročilu krvi opredelili krvno skupino RhD kot RhD poz, prejela 110-120 ml RhD poz transfuzije koncentriranih eritrocitov. V literaturi pri tej obliki RhD var do sedaj ni opisanih primerov nastanka protiteles anti-D. Klinični pomen anti-D, ki jih ob stiku z RhD poz eritrociti razvijejo posamezniki z različnimi RhD var, je odvisen od vrste RhD var. Največji klinični pomen imajo anti-D, ki jih razvijejo RhD neg posamezniki ali posamezniki z velikimi spremembami v genu *RHD*; insercija velikega dela gena *RHCE*, kot npr. pri DVI. Anti-D pri posameznikih z mutacijami, ki spremenijo eno aminokislino na površini proteina, pa so klinično bolj podobni anti-C/c ali-E/e. Večina v literaturi opisanih anti-D pri posameznikih s parcialnimi D, je klinično povzročila blage oblike HBPN.

V drugem primeru smo preiskovankino krvno skupino RhD glede na rezultate tako rutinskega kot razširjenega serološkega testiranja določili kot RhD neg ter priporočili zaščito z Ig anti-D, prejemati mora RhD neg komponente krvi.

V tretjem in četrtem primeru z rutinskimi serološkimi metodami nismo zaznali antigena RhD na površini eritrocitov, z razširjenim serološkim testiranjem smo ga le zaznali, genotipizacija *RHD* pa je pokazala eno izmed variant D. O nadaljnjih ukrepih smo se odločali individualno. Prvi primer, šibek D tip 1, bi lahko obravnavali kot RhD poz preiskovanke, vendar smo zaradi šibke izraženosti antigena RhD vseeno priporočili injiciranje Ig anti-D. Drugi primer, RhD var (*RHD*01W.14* ali *RHD*01W.40* ali *RHD*01W.51* ali *RHD*44 (RHD*DHQ)*), pa bi v vsakem primeru obravnavali kot RhD neg preiskovanke.

Natančna določitev antigena RhD in nadaljnja obravnava se priporoča na podlagi rezultatov genotipizacije *RHD*. Za povečanje verjetnosti, da s serološkim testiranjem zaznamo RhD var, pa se

priporoča določanje antigena RhD z vsaj dvema različnima reagentoma anti-D ali z dvema serološkima metodama.

Zaključek

Določitev antigena RhD je pomembna za prejemnike transfuzij, nosečnice in krvodajalce. Nosilci šibkega D tip 1, 2, 3 in glede na priporočila tudi 4.1 lahko prejmejo RhD poz komponente krvi, nosečnice ne potrebujejo zaščite z Ig anti-D. Pri katerikoli drugi RhD var pa smejo prejemniki krvi prejeti le RhD neg komponente krvi, nosečnice pa potrebujejo zaščito z Ig anti-D. Kri krvodajalcev s katerikoli RhD var lahko prejmejo le RhD poz prejemniki.

Krvno skupino RhD določamo rutinsko s serološkimi metodami. Tistim, pri katerih posumimo na varianto D, pa določimo RhD na podlagi rezultata genotipizacije *RHD*. Omejitve predstavljajo primeri z dodatnimi spremembami sekvenc gena *RHD*, ki niso zajeti v PCR-SSP sistem; te primere je mogoče opredeliti le s sekvenciranjem *RHD*.

Izziv pri določitvi antigena RhD predstavljajo posamezniki, katerim sprva določimo krvno skupino RhD neg ali RhD poz, naknadno pa ugotovimo, da so nosilci RhD var. Prvi zaradi obravnave kot RhD neg posamezniki niso ogroženi za nastanek protiteles anti-D. Pri drugih pa zaradi zmotne obravnave kot RhD poz posamezniki, obstaja tveganje za nastanek protiteles anti-D, ki povzročajo HBPN in HTR. Zato bi se bilo treba v prihodnje osredotočiti na razvoj protokolov za obravnavo primerov, pri katerih serološko ne gre za šibke D, vendar pri njih obstaja tveganje za nastanek protiteles anti-D.

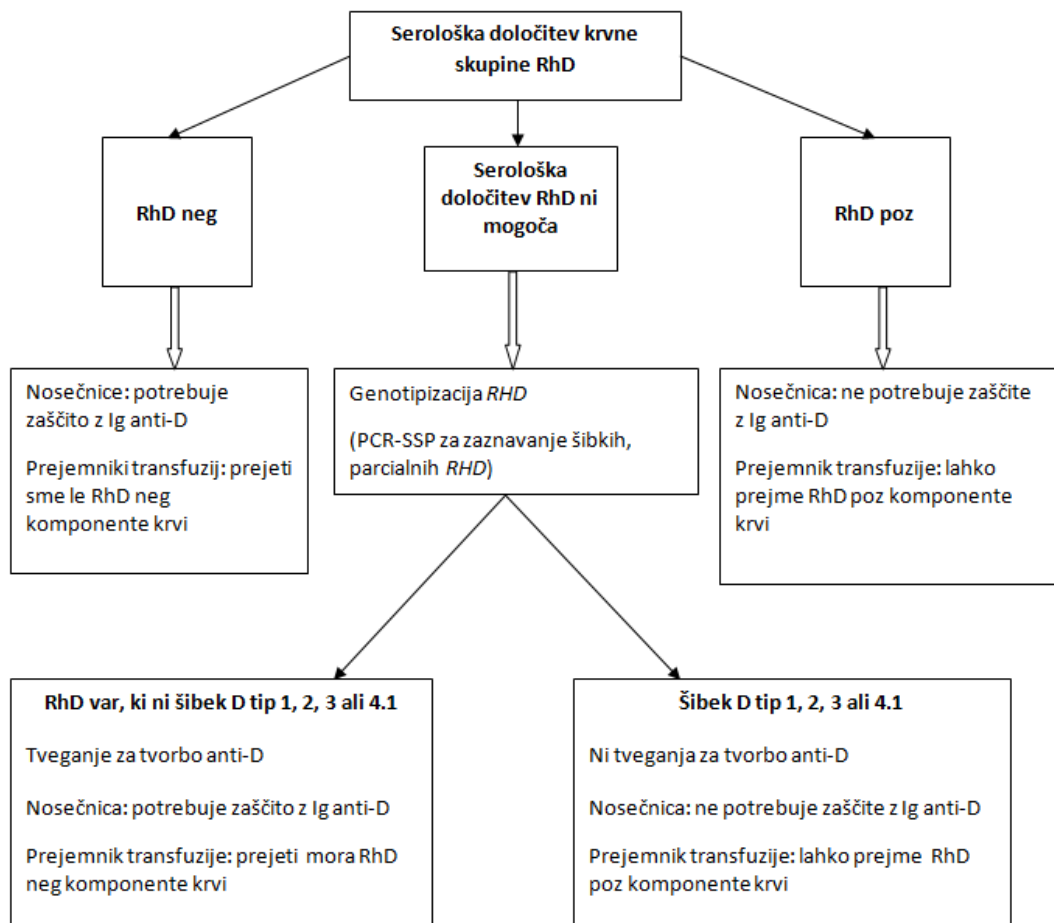
Tabela 1: Prikaz primerov

Primer	Rutinsko serološko testiranje*	Razširjeno serološko testiranje**	Genotipizacija <i>RHD</i> : PCR-SSP***	Obravnava
A	RhD poz	RhD poz	<i>RHD*DCS1/2 ali RHD*DV.02/07</i>	RhD var (izvid krvne skupine: RhD neg, Du poz) -Zaščita z Ig anti-D je indicirana -Prejemati mora RhD neg komponente krvi
B	RhD neg	RhD neg	<i>RHD</i> poz	RhD neg -Zaščita z Ig anti-D je indicirana -Prejemati mora RhD neg komponente krvi
C	RhD neg	RhD var	šibek D tip 1	RhD var (izvid krvne skupine: RhD neg, Du poz) -Zaščita z Ig anti-D je indicirana
D	RhD neg	RhD var	<i>RHD*01W.14 ali RHD*01W.40 ali RHD*01W.51 ali RHD*44 (RHD*DHQ)</i>	RhD neg -Zaščita z Ig anti-D je indicirana -Prejemati mora RhD neg komponente krvi

* na ploščici in v epruveti (komercialni reagent Seraclone anti-D), na gelu (testni sistem z gelskimi karticami DiaClon ABO/D + Reverse Grouping, DiaClon ABO/Rh Confirmation for Patients, DiaClon ABO/Rh for Newborns DVI+, Bio-Rad, Nemčija, DG Gel AB0/Rh 2DVI- in DG Gel Confirm P, Grifols).

** Komercialni set ID-PartialRhD Typing Set, verifikacija šibkega D z metodo z indirektnim Coombsovim testom (ICT, ID Diaclon anti-D), adsorpcija in elucija.

*** PCR-SSP: verižna reakcija s polimerazo s sekvenčno specifičnim prileganjem (PCR-SSP, *angl.* Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Priming) z uporabo komercialnih setov RBC-Ready Gene CDE, RBC-Ready Gene D weak and RBC-Ready Gene D AddOn (Inno-Train; Nemčija).



Slika 1: Shema določanja krvne skupine RhD

Literatura

- 1 Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM, Denomme GA, Delaney M, Keller MA, et al.; College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion*. 2015 Mar;55(3):680–9. <https://doi.org/10.1111/trf.12941> PMID:25438646
- 2 Flegel WA, Denomme GA et al. It's time to phase out "serologic weak D phenotype" and resolve D types with RHD genotyping including weak D type 4. *Transfusion* 2020;60(4):885-859.

3. Mollison Klein HG, Anstee DJ. Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine. 12th edition. John Wiley and Sons, West Sussex, UK. p. 167-213.
5. Flegel WA et al. DCS-1, DCS-2, and DFV share amino acid substitutions at the extracellular RhD protein vestibule. *Transfusion*, 2008(48):25-32. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01506.x
6. Krstic JL et al. Anti-D Antibodies in Pregnant D Variant Antigen Carriers Initially typed as RhD+. *Transfus Med Haemother* 2016;43:419-424.
7. Marianne AJ et al. A case of high-titer anti-D hemolytic disease of the newborn in which late onset and mild course is associated with the D variant, RDH-CE(9)-D. *Transfusion* 2014;54:2463-2467.
8. Denome GA et al. Weak D types with different serologic techniques. 2008;48(March):473-8.
9. Matzhold EM et al. Characterization of Novel RHD Allele variants and Their Implications for routine Blood Group Diagnostics. *Biomedicines* 2024,12,456.
10. Nicoletta O et al. Weak D Type 4.2.2 (DAR1.2) in an African child: Serology and molecular characterization. *Transfusion and Apheresis Science*:52(2015): 217-219.
11. Sandler SG et al. Serological weak D phenotypes: A review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *Br J Haematol* 2017 October;179(1):10-19
12. Armani YO et al. Cases of RhD variants RhD+DAU2/DAu6 and RhD+weak D type 4.1 in pregnant women in Saudi Arabia. *Acta Biomed* 2023;Vol.94, Supplement 1:c2023080.
13. Barrera S et al. The Crawford variant as a cause of RhD typing discrepancies in blood banks: A case report. *Transfus Clin Biol*.2022 Aug;29(3):261-264.

Nacionalna shema zunanje ocene kakovosti imunohematoloških preiskav- 20 let delovanja

Marjeta Maček Kvanka, Mojca Jager, Barbara Peer

Zavod RS za transfuzijsko medicino

marjeta.macek@ztm.si

Uvod

Konec marca 2004 se je na Zavodu RS za transfuzijsko medicino pripravilo prvo poskusno serijo vzorcev za namen nacionalne zunanje ocene kakovosti imunohematoloških preiskav, ki se je zgledovala po obstoječih zunanjih ocenah kakovosti iz tujine. Pobudnici sta bili specialistki transfuziologinji primarij Marjeta Potočnik in primarij Irena Bricl, ki sta pozvali vse imunohematološke laboratorije v Sloveniji, da se vključijo. Od takrat enotna nacionalna shema za zunanjo oceno kakovosti imunohematoloških preiskav (NSZOKIHP) redno deluje in se je v dvajsetih letih delovanja tudi razvijala. Do leta 2007 je shemo organizacijsko vodila Služba vodenja sistema kakovosti, ki je določila čas izvedbe, pripravila spremno dokumentacijo, pomagala pri pošiljanju vzorcev, zbirala vrnjene rezultate in jih analizirala ter pripravila in razposlala poročilo, Odsek za končno kontrolo kakovosti krvnih komponent v sodelovanju z Odsekom za sprejem in izdajo krvnih pripravkov pa je dejansko izbral izhodni material, ga predhodno testiral in pripravil vzorce, ki jih je razposlal sodelujočim laboratorijem. Februarja 2007 je bil sprejet Zakon o transfuzijskih preiskavah in postopkih ob transfuziji, ki je v 12. členu (nadzor kakovosti in referenčni laboratorij) predpisal transfuzijskim laboratorijem obvezno sodelovanje v NSZOKIHP in določil vodenje nacionalne sheme Zavodu RS za transfuzijsko medicino z referenčnim laboratorijem, ki tudi zbira in analizira podatke in o njih poroča (1). Novembra 2007 je osmo zaporedno shemo (2/2007) prvič organiziralo in izvedlo osebje Odseka za referenčne IH preiskave (ORIHP; referenčni laboratorij), ki te naloge še danes izvaja. Do leta 2011 se je NSZOKIHP še izvajala pod vodstvom Službe vodenja sistema kakovosti, ki je bila predvsem pomagala pri dokumentaciji. S sprejetjem sklepa 11/2011 Razširjenega strokovnega kolegija za transfuzijsko

medicino pa je s 1.4.2011 nosilec NSZOKIHP postal ORIHP. S tem so vse zadolžitve in naloge povezane z organizacijo NSZOKIHP prešle na osebje ORIHP. Vodenje in izvajanje NSZOKIHP je izrazito timsko delo, pri katerem ima vsak sodelujoči svoje jasne zadolžitve.

Leta 2004 je v NSZOKIHP sodelovalo 15 IH laboratorijev, maksimalno število v vsem obdobju delovanja je bilo 16 (do leta 2016 še laboratorija Porodnišnice Kranj in Porodnišnice Postojna), sedaj pa sodeluje skupno 14 IH laboratorijev za paciente in krvodajalce iz vse Slovenije: BKB Brežice, TC Celje, CTD Izola, CTD Jesenice, ZTM Ljubljana-Laboratorij za IH testiranje krvodajalcev, ZTM Ljubljana-Predtransfuzijski laboratorij, ZTM Ljubljana-Prenatalni laboratorij, CTM Maribor, CTD Murska Sobota, CTD Nova Gorica, CTD Novo mesto, CTD Ptuj, CTD Slovenj Gradec, CTD Trbovlje (našteti po abecednem redu imena mesta). Sodelovanje laboratorijev je anonimizirano, vsak laboratorij je voden po določeno številko.

Tekom 20 let delovanja se je NSZOKIHP razvijala in izboljševala. Spremembe so narekovale potrebe uporabnikov in zahteve časa. Od začetka je obstajala le vrsta sheme Predtransfuzijske preiskave-ročno testiranje, ki se ji je leta 2011 dodala vrsta Osnovne IH preiskave-avtomatizirana izvedba in leta 2022 še vrsta Predtransfuzijske preiskave-avtomatizirana izvedba. V okviru predtransfuzijskih preiskav laboratoriji določajo krvno skupino (KS) ABO, RhD, K, fenotip Rh, indirektni in direktni Coombsov test (ICT in DCT), navzkrižne preizkuse in določajo specifičnost protiteles. Pri osnovnih IH preiskavah določajo KS ABO, RhD, K, fenotip Rh ter ICT in DCT. Leta 2008 smo povečali število vzorcev testiranje (iz 3 na 4 vzorce). Leta 2009 smo uvedli poleg poročila še grafični prikaz doseženih rezultatov v zadnjih 5 ocenah. Leta 2010 smo uvedli 3 ocene letno (predhodno le 2). Leta 2015 smo dodali preiskavo DCT. Leta 2017 se je dodala možnost določitev titrov-ročno testiranje in leta 2023 še določitev titrov-avtomatizirano testiranje. Od leta 2019 uporabljamo elektronski obrazec za poročanje o rezultatih, ki jih udeleženci izberejo iz nabora ponujenih rezultatov, kar je poenotilo način poročanja.

Namen

Obvezno sodelovanje v NSZOKIHP sodelujočim laboratorijem omogoča oceno lastnega izvajanja laboratorijskih preiskav in predvsem primerjavo doseženih rezultatov z drugimi primerljivimi IH laboratoriji v Sloveniji. Sodelujoči laboratoriji so namreč glede na obseg preiskav, ki jih izvajajo in opremljenost laboratorija s testnimi celicami in reagenti razvrščeni v skupine med seboj primerljivih laboratorijev. V primeru odstopanj laboratoriji sami analizirajo vzroke in predvidijo korektivne ukrepe. Vsaki oceni sledijo poročila in grafični prikazi rezultatov zadnjih petih ocen, ki omogočajo celosten vpogled v stanje delovanja IH laboratorijev v Sloveniji.

Material

V ORIHP od začetka vključenosti v NSZOKIHP zbiramo in shranjujemo enote sveže zmrznjene plazme senzibiliziranih krvodajalcev, ki so jih odkrili ob rutinskem testiranju v Laboratoriju za IH testiranje krvodajalcev ZTM. Vzorce plazme titriramo in ob primerni reaktivnosti protiteles enote sveže zmrznjene plazme (SZP) razdelimo in zamrznemo za bodočo uporabo. Plazmi senzibiliziranih krvodajalcev občasno dodamo poliklonske reagente s pretečenim rokom uporabe. Dodatno uporabljamo tudi plazmo posameznih krvodajalcev, ki nimajo nepričakovanih eritrocitnih protiteles. Za eritrocite smo sprva uporabljali zavržene ali pretečene enote koncentriranih eritrocitov (KE), zadnja leta pa od uporabnih enot KE oddelimo potreben volumen eritrocitov, v vrečki pa mora za uporabo ostati še vsaj 240 ml KE.

Metode

Proces priprave vsake sheme se začne z izbiranjem enot SZP senzibiliziranih krvodajalcev. Ob upoštevanju KS senzibiliziranega krvodajalca, ki nam služi kot vzorec prejemnika, sledi izbira ustreznih eritrocitov za 3 darovalce. Zasledujemo načelo, da naj bodo vzorci eritrocitov čim bolj raznoliki, da po možnosti vključimo takrat razpoložljive posebnosti (npr. DCT+ ali D-var) in da so enaki vzorci testirani pri čim večjem številu uporabnikov. Sledi izračun potrebnega volumna eritrocitov in plazme. Za vsako od treh vrst NSZOKIHP pripravimo 4 kodirane vzorce (en prejemnik in trije darovalci oz. 4 preiskovanci). Za avtomatizirane preiskave pripravimo vzorce polne krvi, za

vsak analizator uporabnik prejme svoj set, za ročne preiskave pa ločene vzorce eritrocitov in plazme. Za določitev titrov protiteles dodamo dodaten vzorec z znanimi eritrocitnimi protitelesi za ročno in avtomatizirano izvedbo. Pri vseh vzorcih pred pošiljanjem s testiranjem preverimo ustreznost in rezultate poslikamo. Sledi priprava navodil za vsako vrsto ocene, priprava paketov z vzorci in pošiljanje naročnikom skladno s prijavo v letni prijavnici. Pakete s testnim materialom pošiljamo po pošti, navodila pa po elektronski pošti. Po vrnitvi rezultatov jih analiziramo z ročnim štetjem pravih oz. napačnih rezultatov. Pripravimo 3 različna poročila za vsako vrsto NSZOKIHP. Odstotek doseženih rezultatov vnesemo v Excel tabelo, ki služi kot podlaga za grafični prikaz doseženih rezultatov. Pripravimo 2 grafična prikaza in sicer za osnovne IH preiskave-avtomatizirano testiranje in skupni prikaz za predtransfuzijske preiskave-ročno in avtomatizirano testiranje. Sledi večkratno preverjanje vsega zapisanega, elektronsko podpisovanje poročil in pošiljanje uporabnikom z elektronsko pošto.

Rezultati

Trenutno pri shemi Predtransfuzijske preiskave (PTP) in določitev titrov z ročnim testiranjem sodeluje skupno 11 laboratorijev, 10 pri PTP in 4 pri določitvi titrov. Pri shemi PTP in določitev titrov z avtomatiziranim testiranjem sodelujejo 4 laboratoriji s skupno 5 analizatorji. Pri shemi Osnovne IH preiskave –avtomatizirano testiranje sodeluje šest laboratorijev s skupno 10 analizatorji.

V nadaljevanju prikazujemo dosežene rezultate za obdobje 10 let. V letih 2014-2024 je bilo izvedenih 31 ocen. Pri predtransfuzijskih preiskavah (skupno ročno in od 2022 avtomatizirano testiranje) so bili v omejenem obdobju doseženi sledeči deleži pravih rezultatov: KS AB0 99,94 %, RhD 99,81 %, K 99,87 %, fenotip Rh (CcEe) 99,24 %, ICT 100 %, DCT 99,87 %, navzkrižni preizkusi 99,22 % in določitev specifičnosti protiteles 99,86 %. Pri interpretaciji predtransfuzijskega testiranja, z deležem pravih rezultatov 97,92 %, gre za subjektivno odločitev udeležencev, ki jo primerjamo z večinsko odločitvijo v primerljivih laboratorijih. Pri osnovnih IH preiskavah je prišlo v enem od šestih sodelujočih laboratorijev zaporedoma pri ocenah 2A/2021 in 3A/2021 do zamenjave vseh vzorcev in posledično do velikega števila

nepravilnih rezultatov, ki pomembno vplivajo na končne rezultate. Če izločimo navedeni oceni iz obravnave, je bil delež pravih rezultatov v letih 2014-2024 sledeč: KS ABO 99,91 %, RhD 99,91%, K 100 %, fenotip Rh 99,65 %, ICT 99,71 % in DCT 99,54 % (z upoštevanjem vseh ocen KS ABO 98,58 %, RhD 99,41 %, K 99,33 %, fenotip Rh 98,29 %, ICT 99,01 % in DCT 98,94 %). Rezultati določitve titrov so na vsakem poročilu navedeni v absolutni številki določenega titra primerjalno med laboratoriji in občasno kažejo na veliko medlaboratorijsko razpršenost rezultatov določanja (tudi več kot 2 titra).

Prevladujoče ugotavljamo posamezne napake, ki so večinoma posledica napak pri vpisovanju rezultatov in ne odstopanj pri izvajanju preiskav. Tudi omenjene zamenjave vzorcev v enem od laboratorijev v dveh zaporednih ocenah, ki so predstavljale najbolj kritično odstopanje od pričakovanih rezultatov, pri rutinskih postopkih ne bi bile mogoče. Občasno se pokažejo razlike v občutljivosti testov pri npr. RhD, NP ali DCT. Kadar ima več uporabnikov enaka odstopanja, se upoštevajo pozitivni in negativni rezultati. V letih 2014-2024 smo dvakrat izločili vzorec iz ocenjevanja (enkrat zaradi lažne reaktivnosti z določenimi testnimi celicami in drugič zaradi raznolikosti rezultatov pri interpretaciji predtransfuzijskega testiranja pri večini udeležencev).

Zaključki

NSZOKIHP uspešno deluje že dvajset let. V njej sodeluje vseh 14 IH laboratorijev v Sloveniji z obsegom preiskav in na način, kot jih izvajajo (ročno ali avtomatizirano). Za 10 od 14 laboratorijev je NSZOKIHP edina zunanja ocena kakovosti. Sodelovanje v NSZOKIHP laboratorijem omogoča oceno lastnega izvajanja laboratorijskih preiskav in predvsem primerjavo doseženih rezultatov z drugimi primerljivimi IH laboratoriji v Sloveniji. Morebitne korektivne ukrepe ob odstopanjih laboratoriji določijo sami. Doseženi rezultati dokazujejo dobro delovanje vseh laboratorijev. Z opisanim načinom delovanja NSZOKIHP pomaga IH laboratorijem pri izboljševanju kakovosti rezultatov in zanesljivosti dela s skupnim ciljem zagotavljanja večje varnosti za paciente.

Literatura

- 1 Pravilnik o transfuzijskih preiskavah in postopkih ob transfuziji (UL RS, št.9/07, dne 2.2.2007)

Transfuzijska medicina in ChatGPT

Matjaž Urbajs

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Šljajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

matjaz.urbajs@ztm.si

Transfuzijska medicina, četudi relativno mlada medicinska specialnost, zagotavlja pomembno podporo izvajanju zdravstvenih storitev na številnih medicinskih področjih. Temelj sodobnega, predvsem varnega zdravljenja s komponentami krvi, zahteva dobro delujočo transfuzijsko službo (TS), organizirano na državni ravni, ki vključuje vabljenje in izbor prostovoljnih krvodajalcev, organizacijo in izvedbo odvzemov polne krvi, plazme in celic (odvzetih bodisi krvodajalcem bodisi pacientom), predelavo krvi, hranjenje komponent krvi, njihovo distribucijo ter izdajo in testiranje vzorcev krvi krvodajalcev ter pacientov. Poleg naštetih dejavnosti TS izvaja tudi svetovanje krvodajalcem in naročnikom komponent krvi oz. vsem uporabnikom njenih storitev. TS za svoje delovanje potrebuje učinkovito izobraževanje zaposlenih, kot tudi naročnikov komponent krvi ter storitev, in ustrezno razvojno in znanstveno raziskovalno dejavnost. Zaradi biološke narave in imunoloških posebnosti komponent krvi je proces zdravljenja s komponentami krvi povezan s tveganji. Zato je v transfuzijski medicini oz. TS zagotavljanje varnosti in kakovosti še posebej poudarjeno, kar se izraža tudi v organiziranosti TS. Podani kratek opis zagotavljanja komponent krvi in storitev ni vseobsegajoč, vendar podaja področja za izboljšavo z uporabo sodobnih tehnologij, kot je umetna inteligenca (UI) ter od leta 2022 dalje širši javnosti dostopna generativna UI v obliki ChatGPT-ja.

ChatGPT (razvilo ga je podjetje OpenAI) predstavlja mejnik v uporabnosti UI, njegove različice 3, 3.5 in 4 pa ponazarjajo hiter razvoj izboljšav v obdelavi naravnega jezika. ChatGPT temelji na tehnologiji transformerjev, ki so jo razvili leta 2017.

Tehnologija transformerjev integrira vrsto dobrih lastnosti predhodno razvitih umetnih nevronskih mrež. Transformerji so prilagojeni vzporednemu računanju na tisočih jedrih grafičnih procesorjev, sprejmejo dokaj dolge vhode, za vsak vhod učinkovito upoštevajo kontekst ostalih vhodov in se dobro obnašajo tudi pri velikih konfiguracijah z milijoni, milijardami in celo več kot bilijardo parametrov. Nevronske mreže tipa transformer so bile prvotno razvite za strojno prevajanje. Delujejo na principu mehanizma 'pozornosti', kar omogoča modelu, da se osredotoči na relevantne dele vhodnega teksta pri generiranju odgovorov. Ta tehnologija je omogočila revolucijo na področju obdelave naravnega jezika in drugih aplikacij UI, saj je znatno izboljšala zmogljivost modelov pri razumevanju in generiranju jezika ter obdelavi slikovnega in avdio materiala. Ti napredki odpirajo nove možnosti za uporabo UI tudi v medicini, vključno s transfuzijsko medicino.

Vpliv ChatGPT in podobnih tehnologij umetne inteligence na transfuzijsko službo je lahko večplasten: z izboljšanim procesom sledenja in nadzora zaloga krvi bi lahko omogočale učinkovitejše odločanje pri izbiri in izdaji komponent krvi, kar bi prispevalo k večji učinkovitosti in varnosti. Pravzaprav vsa področja sistema zagotavljanja krvi (»od vene do vene«) predstavljajo priložnost za izboljšave, ki jih ChatGPT oz. UI omogočata. Vendar bo zaradi novosti tehnologije potrebno konkretne in praktične rešitve vpeljave ChatGPT-ja za večino področij transfuzijske medicine šele odkriti, predvsem pa ustrezno validirati pred njihovo uporabo v praksi.

Avtor prispevka je preveril možnost uporabe ChatGPT-ja na zelo specifičnem področju transfuzijske medicine, ki se ukvarja z laboratorijsko diagnostiko eritrocitnih protiteles v krvi pacienta.

Imunski dražljaji v obliki transfuzije celičnih komponent krvi, nosečnosti ter presaditve solidnega organa in krvotvornih matičnih celic lahko pri pacientu ali nosečnici vzpodbudijo tvorbo eritrocitnih protiteles (Pt). Opredelitev specifičnosti Pt je ključnega pomena za izbor skladnih enot eritrocitov ter za ustrezno vodenje nosečnosti.

Pri preizkusu uporabnosti ChatGPT-ja na področju specifikacije eritrocitnih Pt je bil uporabljen poenostavljen, simuliran primer prisotnosti eritrocitnih Pt v namišljenem vzorcu plazme pacienta.

Uporabljeni so bili podatki o antigenski sestavi enega od setov panelnih eritrocitov (celic), ki ga na ZTM uporabljamo pri rutinskem delu. Podatki o prisotnosti eritrocitnih antigenov za 11 različnih panelnih celic so bili vpisani v Excel-ovo tabelo (prisotnost antigena je označena z 1, odsotnost antigena z 0; netestirani antigeni, 'nt', so bili pri preizkusu uporabnosti ChatGPT-ja izvezeti). V zadnjem stolpcu Excel-ove tabele so bili vpisani simulirani rezultati, ki so prikazovali reaktivnost zamišljenega vzorca plazme s posamičnimi panelnimi celicami: pozitiven rezultat je bil predstavljen z vrednostjo 1, negativen z 0.

V ChatGPT-4 (plačljiva različica) je možno naložiti Excelov dokument, ki ga nato umetna nevronska mreža ChatGPT-ja analizira in poda rezultat. Pogoji za izvedbo analize so ustrezno podana navodila, kako naj ChatGPT dokument analizira. Navodila v obliki besedila vpišemo v pozivno vrstico (t.i. prompt). Kaže, da ChatGPT besedilna navodila za analizo Excel-ove tabele pretvori v programsko kodo Python in nato izvede analizo tabele. V prompt lahko vpišemo tudi navodila za prikaz rezultatov analize.

Z večkratnim (!...) poskušanjem vnosa navodil v prompt je ChatGPT pravilno zaključil možnost prisotnosti protiteles specifičnosti, ki so bile simulirane: anti-D, anti-E, anti-C,

anti-e, anti-c, anti-Cw, anti-K, anti-Jk(a), anti-Fy(b), anti-M, anti-S. V prispevku je prikazan primer s protitelesi anti-E.

Primer s protitelesi anti-E

V tabeli 1 je prikazana vsebina Excelovega dokumenta, ki ponazarja reaktivnost zamišljenega vzorca plazme s protitelesi specifičnosti anti-E. Dokument je bil naložen v ChatGPT-4.

Tabela 1. Reaktivnost namišljenega vzorca plazme, v katerem so protitelesa anti-E, s panelom 11 vzorcev eritrocitov.

Cell-No	D	C	E	c	e	Cw	K	k	Kpa	Kpb	Fya	Fyb	Lua	Lub	Jka	Jkb	M	N	S	s	Lea	Leb	P1	Xga	XM
No.1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
No.2	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
No.3	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
No.4	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0
No.5	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0
No.6	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1
No.7	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
No.8	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0
No.9	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
No.10	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0
No.11	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0

Spodnje besedilo prikazuje rezultat analize tabele 1, kot ga je podal ChatGPT-4, po manjših spremembah v formatu besedila (odgovor podan v angleškem jeziku):

.....

After analyzing the dataset, here are the findings:

Most Probable Antibodies (Not Excluded): The analysis indicates that the antibodies anti-E could not be excluded. This suggests that the patient's plasma may contain antibodies anti-E, as all compatible samples either lack this antigen or all samples with the antigen are incompatible.

Excluded Antibodies: The following antibodies have been excluded based on the presence of at least one compatible red cell sample expressing the antigen, indicating the patient's plasma does not have these antibodies: anti-Leb, anti-Jka, anti-Lea, anti-S, anti-P1, anti-Fya,

anti-Lub, anti-M, anti-Xga, anti-C, anti-s, anti-k, anti-e, anti-Jkb, anti-Kpb, anti-D, anti-c, anti-N, anti-Lua, anti-Cw, anti-Fyb, anti-Kpa, anti-K. This indicates the patient's plasma does not contain these excluded antibodies.

.....

Opazimo lahko, da ChatGPT razloži rezultate, ki jih podaja. Odzive ChatGPT-ja lahko sami preverite, vendar so le-ti zelo odvisni od besedila navodil oz. od vsebine prompta.

Zaključek

Rezultati preverjanja uporabnosti ChatGPT-ja na zelo specifičnem področju transfuzijske medicine, kot je imunohematološko področje razreševanja specifikacije eritrocitnih protiteles, so zelo obetavni. Posebej navdušuje dejstvo, da uporabnik za tovrstne analize ne potrebuje posebnega znanja programiranja (npr. v programskem jeziku Python), ker to pač 'zna' ChatGPT (bi pa verjetno takšno znanje uporabniku koristilo, ker bi lažje razumel delovanje ChatGPT-ja pri analizi podatkov v obliki tabel). Preverjanje uporabnosti ChatGPT-ja zahteva od uporabnika potrpežljivost in vztrajnost ter učenje v podajanju navodil (oz. veščine t.i. 'prompt inženiringa'), vendar je delo s ChatGPT-jem tudi zabavno.

Ob nadaljnjem razvoju 'učjenja nevronske mreže' ChatGPT-ja se prav lahko izkaže, da bo v prihodnosti na razpolago dobrodošel pripomoček UI za opredeljevanje specifičnosti protiteles. Pred uporabo tovrstnega pripomočka v praksi bo potrebno izvesti temeljito validacijo specifično naučene nevronske mreže (npr. ChatGPT-ja), podobno kot je validacija obvezna pred vsako uvedbo novega testa, novega analizatorja, ali novega informacijskega sistema. Hkrati z uporabo ChatGPT-ja oz. UI bo potrebno tudi ustrezno nasloviti izzive, kot so: varstvo podatkov, etika uporabe, pristranskost, enakopravnost, transparentnost in zanesljivost odgovorov, ki jih UI podaja.

Literatura

- 2 Smit Sibinga CT. Artificial Intelligence and the future of Transfusion Medicine. *Neurosci Chron* 2021; 2(2):25-30.
- 3 Špela Vintar Š. Jezik in umetna inteligenca: kam nas vodijo veliki jezikovni modeli, 2023, Filozofska fakulteta, Ljubljana, DOI: 10.4312/SSJLK.59.21-28.

- 4 Robnik-Šikonja M. Veliki jezikovni velikani: so tudi prijazni? *Alternator*, 2023 [cited 2024 Apr 01]. Available from: <https://www.alternator.science/sl/daljse/veliki-jezikovni-velikani-so-tudi-prijazni/>.
- 5 Isaac S. Kohane. Injecting Artificial Intelligence into Medicine. DOI: 10.1056/Ale2300197, *NEJM AI* 2023; 1 (1).
- 6 Vaswani A, Shazeer N, Parmar N, Uszkoreit J, Jones L, Gomez NA, et al. Attention Is All You Need. 31st Conference on Neural Information Processing Systems (NIPS 2017), Long Beach, CA, USA. [cited 2024 Apr 01]. Available from: <https://arxiv.org/pdf/1706.03762.pdf>.

Hemovigilanca (ZTMS)

TACO - s transfuzijo povezana volumska preobremenitev
Ljubljana

Aleksandra Bajt, Irena Bricl

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Šljajmerjeva ulica 6, 1000

aleksandra.bajt@ztm.si

Izveček

TACO, s transfuzijo povezana volumska preobremenitev, je poleg TRALI in TAD ena izmed treh *primarnih respiracijskih neželenih transfuzijskih reakcij*. Je *najpogostejša* med njimi, v zadnjih letih pa tudi *najpogostejši* vzrok za s transfuzijo povezano zboleznostjo in umrljivostjo v deželah z razvito transfuzijsko službo. Pri predisponiranih bolnikih se med ali v 12 urah po transfuziji zaradi volumske preobremenitve razvije kardiogeni pljučni edem, ki se lahko kaže kot tahipneja, dispneja in hipoksemija ter tahikardija, hipertenzija, prekomerno polnjene vratne vene in periferni edemi. Zaradi bremena, ki ga TACO predstavlja in možnosti preprečevanja te hude neželene transfuzijske reakcije, je v središču pozornosti hemovigilančnih služb po svetu. Nekatere med njimi so pripravile informativno gradivo, opomnike in predtransfuzijske sezname, ki so v pomoč zdravnikom pri prepoznavanju in predtransfuzijski pripravi bolnikov z dejavniki tveganja za TACO. Zdravnike opozarjajo, da je pri teh bolnikih potreben dodaten nadzor in prilagoditev volumna ter hitrosti transfuzije krvnih komponent. Če do nastanka TACO vendarle pride, je nujno takojšnje ukrepanje: prekinitve transfuzije z ohranitvijo i.v. dostopa, posedanje bolnika in zdravljenje z dodatkom kisika ter i.v. aplikacijo diuretika Henlejeve zanke. Po oskrbi in izboljšanju stanja bolnika je potrebno ne glede na stopnjo neželene transfuzijske reakcije le-to prijaviti Hemovigilančni službi. Le tako bomo imeli boljši pregled nad neželenimi transfuzijskimi reakcijami pri nas in možnost ukrepanja v prihodnje. Vse za varnejšo transfuzijo.

Abstract

TACO, Transfusion-Associated Circulatory Overload, is one of the three *primary respiratory adverse transfusion reactions* alongside TRALI and TAD. Although underdiagnosed and underreported it is still the most common of these. In recent years TACO has become the *leading cause* of transfusion-related morbidity and mortality in countries with well-developed transfusion service. Predisposed patients develop cardiogenic pulmonary edema during or within 12 hours after transfusion due to volume overload, which may manifest as tachypnea, dyspnea, hypoxemia, as well as tachycardia, hypertension, jugular venous distension and peripheral edema. TACO has come into the limelight of hemovigilance services worldwide due to the *heavy burden* it places on healthcare system and the possibility of preventing this severe adverse transfusion reaction. The best among them published informational materials, reminders and pre-transfusion checklists to help physicians *identify* patients with risk factors for TACO and act accordingly. Physicians are thus warned that these patients require additional surveillance and *adjustment* of the *volume* of blood components and *rate* of transfusion. If TACO does occur, immediate action is required: *stop* the transfusion while maintaining IV access, place the patient in a sitting position, provide supplementary *oxygen* and reduce the intravascular plasma volume with *loop diuretics*. In our country *reporting* to the Hemovigilance Service is mandatory regardless of the degree of the adverse transfusion reaction. A better overview of the adverse transfusion reactions and the possibility of taking preventive action will be acquired only by diligent reporting. Everything to further improve blood transfusion safety.

Uvod

S transfuzijo povezana volumska preobremenitev (*angl.* Transfusion-Associated Circulatory Overload, TACO) je najpogostejša *respiracijska neželena transfuzijska reakcija* (NTR). Transfuzija krvnih komponent (KK) lahko pri bolnikih z dejavniki tveganja privede do volumske

preobremenitve srca s tekočinami in posledično kardiogenega pljučnega edema. Incidenca TACO se giblje med 1 % in 5,5 %, v odvisnosti od preučevane skupine bolnikov, znanja lečečih zdravnikov in načina zbiranja hemovigilančnih podatkov. Zaradi različne stopnje ogroženosti bolnikov, prekrivanja klinične slike z bodisi drugimi NTR bodisi pridruženimi boleznimi pri hudo bolnih, TACO pogosto ostane neprepoznan in neprijavljen. Ne le da bolniki s TACO potrebujejo intenzivnejše zdravljenje in daljšo bolnišnično oskrbo, v zadnjih letih je tudi najpogostejši vzrok za s transfuzijo povezano umrljivostjo v državah z razvito transfuzijsko službo.

Klinična slika in definiciji

Delovna skupina Mednarodnega združenja za transfuzijsko medicino (*angl.* International Society of Blood Transfusion, ISBT) je v sodelovanju z Mednarodno zvezo za hemovigilanco (*angl.* International Hemovigilance Network, IHN) in Ameriškim združenjem krvnih bank (American Association of Blood Banks, sedaj Association for the Advancement of Blood & Biotherapies, AABB) leta 2018 pripravila novo, revidirano in validirano definicijo TACO. Pri validaciji je sodelovala kot članica IHN tudi Služba RS za hemovigilanco. V ZDA je bila leta 2021 sprejeta v vseh bistvenih točkah podobna definicija Nacionalne zveze za varnost v zdravstvu (*angl.* National Healthcare Safety Network, NHSN) in Centra za obvladovanje in preprečevanje bolezni (*angl.* Centers for Disease Control and Prevention, CDC). Vsebini obeh sta prikazani v Tabeli 1. Pri bolniku je po definiciji ISBT/IHN/AABB potrjena diagnoza TACO, če so izpolnjeni najmanj trije spodaj navedeni kriteriji, od katerih mora biti vsaj eden obvezni (*).

2018 ISBT/IHN/AABB definicija TACO**2021 NHSN (CDC) definicija TACO**

med ali do 12 ur po transfuziji	do 12 ur po zaključeni transfuziji
I. akutna dihalna stiska ali slabšajoča se respiratorna simptomatika* in/ali akutni ali pljučni edem v poslabšanju* (dokazan s kliničnim pregledom in/ali RTG pc ali drugo neinvazivno diagnostiko za oceno srčne funkcije)	I. akutna dihalna stiska ali poslabšanje le-te (dispneja, tahipneja, cianoza in hipoksemija ob odsotnosti drugih vzrokov)
II. spremembe v kardiovaskularnem sistemu, ki jih ni mogoče pojasniti z bolnikovo osnovno boleznijo ⁺ (tahikardija, hipertenzija, prekomerno polnjene vratne vene, povečana srčna senca na RTG pc in/ali periferni edemi)	II. s kliničnim pregledom ali s slikovno diagnostiko dokazan akutni ali pljučni edem v poslabšanju (avskultatorno inspiratorni poki in tretji srčni ton, ortopneja, kašelj, rožnat penast izmeček)
III. dokaz o preobremenitvi s tekočinami ⁺ (pozitivna bilanca tekočin ali klinično izboljšanje po diuretiki terapiji)	III. spremembe v kardiovaskularnem sistemu, ki jih ni mogoče pojasniti z bolnikovo osnovno boleznijo (povišan CVP, dokaz o levostranskem srčnem popuščanju, vključno s tahikardijo, hipertenzijo, povišanim pulznim tlakom, prekomerno polnjenimi vratnimi venami, povečano srčno senco na RTG pc in/ali perifernimi edemi)
IV. povišanje vrednosti BNP ali NT-proBNP ⁺ nad povprečje za starost in več kot 1,5-krat nad predtransfuzijsko vrednost	IV. dokaz o preobremenitvi s tekočinami
	V. povišanje vrednosti BNP ali NT-proBNP
Za diagnozo TACO je potreben vsaj eden od obveznih (*) kriterijev in skupno 3 ali več (obveznih (*) in/ali dodatnih (+)).	Za diagnozo TACO so potrebni vsaj 3 zgoraj navedeni kriteriji.

Tabela 1: Definiciji TACO ISBT/IHN/AABB in NHSN, povzeto po van den Akker et al *Transfusion-Associated Circulatory Overload and Transfusion-Related Acute Lung Injury in National Healthcare Safety Network Biovigilance Component Hemovigilance Module Surveillance Protocol*

Pri bolnikih z dejavniki tveganja lahko hitra transfuzija in/ali veliki volumni transfundiranih KK privedejo med ali v 12 urah po transfuziji do akutne dihalne stiske in/ali akutnega pljučnega edema. Kažeta se z naslednjimi simptomi in znaki: dispneja, tahipneja, cianoza, hipoksemija, tahikardija, hipertenzija, ortopneja, prekomerno polnjene vratne vene, hiter porast telesne teže in periferni edemi. Izmed naštetih pri bolnikih s TACO najpogosteje najdemo dispnejo, povišan krvni tlak in zmanjšano nasičenost krvi s kisikom. V skoraj tretjini primerov nastopi po transfuziji povišana telesna temperatura. Pri avskultaciji pljuč lahko slišimo inspiratorne pike, pri poslušanju srca pa tretji srčni ton. Na RTG posnetku prsnih organov (RTG pc) lahko vidimo povečano srčno senco in difuzne infiltrate v pljučih, na elektrokardiogramu pa novonastale spremembe segmenta ST in T vala. Tlak v pljučni arteriji je višji od 18 mmHg, centralni venski tlak (CVP) pa višji od 12 mmHg. Z ultrazvokom srca lahko potrdimo sistolno in/ali diastolno srčno disfunkcijo.

V laboratorijskih izvidih bolnikov s TACO sta zaradi obremenitve in raztezanja miokarda povišana BNP in NT-proBNP. Natriuretična peptida povzročita vazodilatacijo arterij in ven in z zmanjšano resorpcijo Na⁺ v ledvicah povečata izločanje urina. Meritev je potrebno opraviti čimprej po NTR, vsekakor pa znotraj 24 ur. TACO je malo verjeten, če je BNP < 300 pg/ml ali NT-proBNP < 2000 pg/ml. Pri kritično bolnih sta označevalca srčnega popuščanja lahko povišana tudi pri bolnikih s transfuzijo povezano akutno okvaro pljuč (*angl.* Transfusion-Related Acute Lung Injury, TRALI). Definicija ISBT/IHN/AABB iz leta 2018 vključuje meritve BNP in NT-proBNP kot dodatni potrditveni kriterij za TACO, če sta višja od referenčne vrednosti za določeno starost in višja od 1,5-kratnika predtransfuzijske vrednosti.

Diferencialna diagnoza

Akutna dihalna stiska med ali po transfuziji je lahko posledica ene od treh *primarnih* respiracijskih NTR: TACO, TRALI in s transfuzijo povezano dispnejo (*angl.* Transfusion Associated Dyspnea, TAD) ali pa *sekundarnih* respiracijskih NTR: akutne hemolitične transfuzijske reakcije (AHTR), anafilaktične reakcije in s transfuzijo povezane sepse. Možna vzroka sta še s transfuzijo nepovezan

sindrom akutne dihalne stiske (*angl.* Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) ali pa poslabšanje srčnega popuščanja. TACO in TRALI sta lahko prisotna sočasno. Za diagnozo **TAD** se odločimo tedaj, ko se dispneja pojavi do 24 ur po koncu transfuzije in niso izpolnjeni kriteriji za nobeno od prej navedenih NTR. Za **TRALI** je značilen pojav dihalne stiske in hipoksemije ter pljučnega edema med ali v 6 urah po transfuziji KK, ki vsebujejo plazmo. Spremlja jo hipotenzija in povišana telesna temperatura. Pljučni edem ne sme biti posledica hipertenzije levega preddvora, prav tako ne smejo biti prisotni dejavniki tveganja za ARDS. Na RTG pc je moč videti obojestranske infiltrate pljuč.

Epidemiologija in dejavniki tveganja

Do TACO lahko pride v kateremkoli življenjskem obdobju, vendar je pogostejši pri starejših od 70 let in pri mlajših od 3 let. Dejavniki tveganja vključujejo vse tiste pridružene bolezni ali stanja, ki krnijo bolnikovo sposobnost odzivanja na volumsko obremenitev krvnega obtoka: srčne, pljučne in ledvične bolezni, huda anemija, pozitivna bilanca tekočin, nizka telesna teža itd. Britanska hemovigilančna služba SHOT (*angl.* Serious Hazards of Transfusion) je na predtransfuzijski seznam dejavnikov tveganja za TACO (*angl.* TACO Pretransfusion Checklist), ki ga preverjajo bolnišnični zdravniki pred naročanjem in transfuzijo KK, uvrstila: srčno popuščanje, aortno stenozo, disfunkcijo levega prekata, pljučni edem, respiratorne simptome nejasne etiologije, pozitivno bilanco tekočin, sočasno infuzijo drugih tekočin, periferne edeme, hipoalbuminemijo, ledvično odpoved, diuretično terapijo in hudo anemijo. V SHOT poročilu za leto 2016 so prvič svetovali odmerjanje volumna koncentriranih eritrocitov (KE) glede na telesno težo pri bolnikih, ki ne krvavijo. V naslednjih letih so izdelali in validirali spletno računalno (*angl.* Red Cell Dosage Calculator), ki omogoča izračun bolnikovi teži prilagojenega volumna KE. Aplikacija upošteva izhodiščno vrednost hemoglobina, vzrok anemije in pridružene bolezni ter dejavnike tveganja.

Delež TACO med prijavi NTR, zbranimi v hemovigilančnih službah v Veliki Britaniji, ZDA, Kanadi in na Nizozemskem, se z leti povečuje. Večina primerov TACO je povezana s transfuzijo KE, včasih

nastopi po transfuziji več različnih KK, redkeje po transfuziji sveže zmrznjene plazme ali trombocitnih pripravkov. V 20 % primerov je zadostovala že transfuzija 1 enote KE.

Incidenca TACO v skupini hudo bolnih v enotah intenzivne nege znaša 5,5 % in je višja kot med hospitaliziranimi na drugih oddelkih. Ti bolniki imajo več pridruženih bolezni in dejavnikov tveganja že pred samo transfuzijo. Incidenca TACO pri otrocih je slabše definirana, eden od dostopnih podatkov je 3,4 %. Številke so višje, če se podatke pridobiva aktivno. Z več raziskavami je bilo dokazano, da pasivno zbiranje podatkov podceni incidenco TACO. V prihodnje bi bila lahko v pomoč vzpostavitev algoritmov za hemovigilančni nadzor elektronskih zdravstvenih kartonov.

TACO je v zadnjem desetletju postal glavni razlog za s transfuzijo povezano zbolewnostjo in umrljivostjo. Britanski SHOT je leta 2018 izmed vseh hudih NTR na račun TACO beležil 33 % zbolewnost in 25 % umrljivost. Nizozemska hemovigilančna služba je poročala, da je TACO od leta 2014 najpogosteje povezan s podaljšanjem bolnišničnega zdravljenja in od leta 2016 najpogostejši vzrok za s transfuzijo povezano umrljivostjo. Od tega leta enako navaja tudi FDA (*angl.* Food and Drug Administration), ki beleži NTR v ZDA.

Patofiziologija

Transfuzija KK pri dovzetnih bolnikih poviša CVP, poveča se volumen krvi v pljučih in zmanjša komplanca pljuč, kar privede do kongestivne srčne odpovedi in pljučnega edema. K temu prispevata tako hitrost transfuzije kot tudi veliki volumni transfundiranih KK.

V zadnjih letih se za razlago nastanka TACO, podobno kot TRALI, vedno bolj uveljavlja **model dveh udarcev** (*angl.* Two-Hit Model). Prvi se nanaša na bolnikove dejavnike tveganja pred transfuzijo, ki zmanjšujejo njegovo zmožnost prilagajanja na obremenitve s tekočinami. Drugi udarec pa prispeva transfuzija KK z neustrezno hitrostjo transfundiranja, pomanjkljivim nadzorom nad bilanco tekočin, z vazoaktivnimi substancami v sami komponenti ali kombinacijo naštetega.

V svetu potekajo raziskave o alternativnih mehanizmih za sprožitvev TACO, ki bi pojasnili pridobljene podatke o vnetni komponenti te hude NTR. *Prvi mehanizem* je podoben nastanku

TRALI, vnetni proces pri TACO vključuje aktivacijo nevtrofilcev s posledično večjo prepustnostjo kapilar, ki ob hkratnem blagem hidrostatskem tlaku prispeva k pljučnemu edemu. Ta model podpirata tako zmanjšanje incidence TACO za 49 % po uvedbi levkoredukcije, kot podoben upad incidence po uporabi patogensko inaktivirane plazme. Vnetna etiologija TACO bi pojasnila tudi pojav povišane telesne temperature nad 38° C pri 31,8 % bolnikov in povišane potransfuzijske vrednosti provnetnega IL-6.

Drugi mehanizem vključuje poškodbo endotelija pljučnega žilja, do katere pride ob vnetju ali transfuziji. Ob okvari se neto filtracija tekočine v intersticijski prostor lahko poveča za desetkratnik in več. Endotelijski glikokaliks tvori pregrado ter regulira izmenjavo tekočin in topnih snovi preko endotelijske stene. Znotrajžilni osmotski tlak nasprotuje hidrostatskemu tlaku in s tem preprečuje izgubljanje tekočine iz žilja. Endotelijski glikokaliks omogoča tudi od pritiska strižnih sil odvisno povečanje prepustnosti z mehanotransdukcijo. Strižne sile na endotelij se povečajo z večjim pretokom krvi v pljučnih kapilarah po transfuziji, sledi aktivacija celičnih signalnih poti in povečanje prepustnosti endotelija. Obenem sproži nastajanje NO, ki sicer na mestu delovanja povzroči vazodilatacijo, vendar hkrati poveča vnetje in prepustnost žilja.

Tretji mehanizem je posledica razpadnih produktov v KK, kot so produkti hemolize, mikrodelci in prosti hemoglobin. Pri hemolizi eritrocitov med shranjevanjem ali po transfuziji se sprosti hemoglobin, ki se z NO veže v methemoglobin. Pri tem se porablja NO, pride do vazokonstrikcije ter dviga hidrostatskega tlaka. Večina primerov TACO, ki jih zabeležijo hemovigilančne službe, nastane po transfuziji KE. Neugodni učinki razpadnih produktov KE na prejemnike so bili dokazani v več raziskavah, vendar velike randomizirane raziskave doslej niso potrdile koristi transfuzije svežih KE in trombocitnih pripravkov v primerjavi s standardnimi. Raziskave o dobrobiti opranih celičnih KK za preprečevanje TACO še potekajo.

Preventiva in zdravljenje

Ključnega pomena za preprečevanje TACO je prepoznavanje bolnikov z dejavniki tveganja. Številne nacionalne hemovigilančne službe so izdelale orodja za oceno tveganja, ki so v pomoč zdravnikom v bolnišnicah. Za hudo anemične in bolnike z nižjo telesno težo je nujna prilagoditev volumna transfundiranih KE. V Veliki Britaniji je na voljo spletna aplikacija za pomoč zdravnikom pri izračunu. Če korist transfuzije odtehta tveganja, je potrebno pri ogroženih bolnikih zmanjšati hitrost transfuzije na 1 ml/kg TT/uro, vendar se ne sme prekoračiti okvira 4 ur za transfuzijo 1 enote KK. Pred transfuzijo se svetuje ocena bilance tekočin in po presoji zdravnika aplikacija diuretika Henlejeve zanke. Med transfuzijo je potrebno spremljati bolnikovo počutje.

Ob pojavu NTR reakcije je nujno takoj ustaviti transfuzijo, ohraniti i.v. dostop, preostanek enote in transfuzijski set pa shraniti. Če simptomi in znaki NTR reakcije kažejo na TACO je potrebno: bolnika namestiti v sedeč položaj, ga zdraviti z dodatkom kisika in i.v. aplikacijo diuretika Henlejeve zanke. Povišan krvni tlak znižujemo z nitrati, občutek težkega dihanja pa olajšajo morfinski pripravki. Če simptomi in znaki vztrajajo, se ponovi aplikacija diuretika, v literaturi pa je opisana tudi terapevtska flebotomija.

Zaključek

TACO je postal glavni vzrok za s transfuzijo povezano zbolewnostjo in umrljivostjo. Po eni strani prispevajo k pojavljanju TACO bolnikove pridružene bolezni in stanja, po drugi pa tudi dejavniki, na katere lahko vplivajo zdravstveni delavci. S pripravo bolnika na transfuzijo in ustrezno izbiro hitrosti in volumna transfundirane KE je mogoče TACO **preprečiti**. V tujini so zdravnikom v pomoč orodja za prepoznavanje bolnikov z dejavniki tveganja in orodja za izračun priporočenega volumna KE. Če do NTR pride, pa je izjemnega pomena hitro prepoznavanje in ukrepanje s prekinitvijo transfuzije, posedanjem bolnika, zdravljenjem s kisikom in diuretikom Henlejeve zanke.

Nenazadnje je poleg zdravnikove sposobnost prepoznavanja bolnikov z dejavniki tveganja in znanja o preprečevanju ter zdravljenju TACO pomembna tudi njihova osveščenost glede prijavljanja NTR hemovigilančni službi. V Sloveniji je po zakonodaji obvezno prijavljati vse NTR, tudi blage. V prihodnje bo potrebno zdravnikom olajšati administrativno breme prijav in jim omogočiti ne le elektronsko naročanje KK, temveč tudi elektronsko prijavljanje NTR. Učinkovit sistem bi moral vključevati tudi povratno informacijo Hemovigilančne službe o vrsti NTR in napotke za ravnanje ob naslednjih transfuzijah.

Literatura

1. Marić I, Mlakar P, Bricl I. Respiracijske transfuzijske reakcije. Zdrav Vestn. 2017;86:414-21.
2. Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM, ed. Technical Manual. 21th ed., Bethesda: AABB; 2023.p.675-708.
3. Kopko PM, ed. Transfusion Reactions. 5th ed., Bethesda: AABB; 2021.p.331-348.
4. Semple JW, Rebetz J, Kapur R. Transfusion-associated circulatory overload and transfusion-related acute lung injury. Blood. 2019;133(17):1840-1853.
5. Bajt A, Bricl I, Marić I. S transfuzijo povezana volumska preobremenitev. Zdrav Vestn. V tisku 2024.
6. Van den Akker TA, Grimes ZM, Friedman MT. Transfusion-associated circulatory overload and transfusion-related acute lung injury. Am J Clin Pathol 2021;156(4):529-539.
7. Bulle EB, Klanderman RB, Pendergast J, Cserti-Gazdewich C, Callum J, Vlaar APJ. The recipe for TACO: A narrative review on the pathophysiology and potential mitigation strategies of transfusion-associated circulatory overload. Blood Rev. 2022;52:100891.
8. Bosboom JJ, Klanderman RB, Migdady Y, Bolhuis B, Veelo DP, Geerts BF et al. Transfusion-associated circulatory overload: A clinical perspective. Transfus Med Rev. 2019;33:69-77.
9. Roubinian NH, Hendrickson JE, Triulzi DJ, Gottschall JL, Michalkiewicz M, Chowdhury D et al. Contemporary risk factors and outcomes of transfusion associated circulatory overload. Crit Care Med. 2018;46(4):577-85.
10. Marić I, Bricl I. Hemovigilanca – poročilo Službe za hemovigilanco za leto 2020. Isis. 2021;11:48-49.
11. International Society of Blood Transfusion Working Party on Haemovigilance. Transfusion-associated circulatory overload (TACO) definition. 2018. [cited 2024 Mar 19] Available from:

https://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/TACO_2018_definition_March_2019.pdf

12. Wiersum-Osselton JC, Whitaker B, Grey S, Land K, Perez G, Rajbhandary S et al. Revised international surveillance case definition of transfusion-associated circulatory overload: a classification agreement validation study. *Lancet Haematol*. 2019;6:e350-58.
13. Centers for Disease Control and Prevention. National healthcare safety network biovigilance component haemovigilance module surveillance protocol. 2021. [cited 2024 Mar 19] Available from: <https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/biovigilance/bv-hv-protocol-current.pdf>
14. SHOT, Annual SHOT report 2021. Reactions in patients. 17a Transfusion-Associated circulatory Overload (TACO) [cited 2024 Mar 19] Available from: <https://www.shotuk.org/shot-reports/report-summary-and-supplement-2021/2021-annual-shot-report-individual-chapters/>
15. Roubinan N. TACO and TRALI: biology, risk factors, and prevention strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2018;2018(1):585-594.

Dihalna stiska ob transfuziji krvi: izkušnje v UKC Maribor

Nina Šulek Sisinger, Bojana Bizjak

Center za transfuzijsko medicino, UKC Maribor

nina.sulek@gmail.com

Uvod

Težave z dihanjem ob transfuziji krvnih komponent predstavljajo velik izziv, saj so lahko prisotne ob različnih neželenih transfuzijskih reakcijah. Lahko se pojavljajo v sklopu respiracijskih transfuzijskih reakcij ali v sklopu drugih transfuzijskih reakcij, kot so hemolitična, febrilna nehemolitična in alergijska oziroma anafilaktična reakcija ter ob transfuziji z bakterijami kontaminiranih krvnih pripravkov. Med zaplete, pri katerih so primarno prizadeta pljuča, uvrščamo akutno poškodbo pljuč oziroma TRALI (angl. transfusion-related acute lung injury), s transfuzijo povezano volumsko preobremenitev oziroma TACO (angl. transfusion-associated circulatory overload) ter s transfuzijo povezano dispnejo oziroma TAD (angl. transfusion-associated dyspnea). Lahko pa je težko dihanje tudi posledica bolnikove osnovne bolezni in samo naključno sovpada s transfuzijo krvi.

TRALI definiramo kot akutno okvaro pljuč, ki je nastala med transfuzijo ali v šestih urah po transfuziji krvi, prisotna je hipoksemija (definirana s $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$ ali $\text{SpO}_2 < 90\%$), na RTG sliki pljuč so vidni obojestranski infiltrati, ob tem pa ni znakov za volumsko preobremenitev oziroma hipertenzijo levega atrija. Delimo ga na imunsko in neimunsko obliko.

Simptomi in znaki, ki so značilni za TRALI so obojestranski pljučni edem, hipoksemija, tahikardija, vročina (povišanje za 1-2 °C) ter hipotenzija, ki je neodzivna na dajanje intravenskih tekočin. Dihalna stiska se kaže kot dispneja ali cianoza. Edem je lahko najprej omejen na spodnji del pljuč, v nekaj urah pa po navadi zajame celotna pljuča.

Vsi ti simptomi in znaki se pojavijo med transfuzijo ali v do 6 urah po transfuziji krvi, ponavadi v 1 do 2 urah po začetku. Za razliko od volumske preobremenitve, imajo pacienti z reakcijo TRALI normalen ali nizek pljučni zagozditveni tlak.

TACO se razvije v šestih urah po transfuziji s simptomi in znaki kot so dispneja, tahipneja, ortopneja, cianoza, hipoksemija, tahikardija, hipertenzija, razširitev jugularnih ven, pljučni edem, kardiomegalija. V laboratorijskih izvidih sta značilna zvišana BNP in NT-proBNP.

TAD je akutna dihalna stiska, ki se pojavi v 24 urah po zaključku transfuzije in ne ustreza kriterijem za TACO ali TRALI. Kaže se kot tahipneja, znižana saturacija kisika v krvi ali dispneja.

Namen

S pregledom neželenih transfuzijskih reakcij z dihalno stisko v zadnjih desetih letih v UKC Maribor smo želeli ugotoviti, kolikšen delež predstavljajo respiracijske transfuzijske reakcije, kakšne simptome in znake so imeli bolniki ob teh neželenih reakcijah in koliko sumov na te reakcije je bilo potrjenih. Preverili smo tudi, pri katerih drugih reakcijah so imeli bolniki prisotne simptome s strani dihal.

Material in metode

Analizirali smo prijave in poročila o neželenih reakcijah ob transfuziji krvi, ki smo jih prejeli v CTM UKC Maribor v letih 2014-2023.

Rezultati

V letih 2014-2023 smo v CTM UKC Maribor obravnavali 133 neželenih transfuzijskih reakcij. Med njimi je bila v 23 primerih kot eden od simptomov navedena dihalna stiska, kar predstavlja 17,3 % vseh reakcij. V večini primerov je prišlo do reakcije po transfuziji eritrocitov – 15 prijav (65%) in po prejetju trombocitov. 15 neželenih reakcij (11,3 % vseh transfuzijskih reakcij) je bilo uvrščenih med respiracijske reakcije.

V 12 primerih smo ugotavljali TACO, od tega so bili v 5 primerih (41 %) bolniki življenjsko ogroženi, v 7 primerih pa ni bilo znakov življenjske ogroženosti. Podoben delež (48 %) so hude volumske

preobremenitve predstavljale na področju cele Slovenije med leti 2003-2010, medtem ko je po podatkih v literaturi delež hudih preobremenitev 21 %, kar lahko nakazuje na to, da se pri nas lažjih primerov ne povezuje s transfuzijo in jih ne prijavlja. Starostna razporeditev bolnikov s TACO je primerljiva s podatki iz literature. 10 bolnikov (83 %) je bilo starejših od 60 let, dva bolnika pa sta bila stara med 30 in 35 let. Oba mlajša bolnika sta sicer imela hudo osnovno bolezen. Ob težkem dihanju je bil prevladujoč spremljajoč simptom tahikardija, ki jo je imelo 9 bolnikov (75%).

Obravnavali smo pet primerov suma na TRALI, ki je bil potrjen v enem primeru in opredeljen kot neimunski TRALI. Vse reakcije, ki so bile opredeljene kot možni TRALI, so bile hude, označene kot S2. Štiri reakcije, pri katerih je bil nato sum na TRALI ovržen, so bile zaključene kot TACO, kar kaže na težavno razlikovanje med tema dvema reakcijama zaradi zelo podobnih začetnih simptomov.

V dveh primerih je bila reakcija opredeljena kot TAD. Bolnika nista bila resneje prizadeta, reakciji sta bili označeni s S1. V enem primeru je bilo prisotno samo težko dihanje, v drugem pa je bila pridružena še bolečina v prsih.

V analiziranem obdobju je bilo zabeleženih 35 nehemolitičnih febrilnih transfuzijskih reakcij, ki jih je v šestih primerih spremljalo težko dihanje, kar predstavlja 17 % vseh NHFTR. Težko dihanje kot simptom je bilo navedeno tudi v dveh primerih alergijskih reakcij.

Zaključek

Dihalna stiska je relativno pogost simptom širokega spektra neželenih transfuzijskih reakcij. TACO ostaja ena najpogostejših hudih neželenih reakcij. Med transfundiranjem krvi je zato potrebno primerno odmerjanje volumna in hitrosti transfuzije glede na stanje bolnika in skrben nadzor nad bolnikom, ki omogoča pravočasno prepoznavanje neželene transfuzijske reakcije in pravilno ukrepanje, s katerim lahko preprečimo nastanek življenje ogrožajočega stanja. Predvsem je potrebna previdnost pri transfuziji krvi najbolj ogroženim bolnikom, ki so starejši od 70 let, tisti z nizko telesno težo, bolniki s srčnimi in ledvičnimi boleznimi ter bolniki, ki so že pred transfuzijo

preobremenjeni s tekočino, saj ta stanja omejujejo zmožnost uravnavanja tekočinskega ravnovesja.

Pojavnost TRALI se je s preventivnimi ukrepi, kot so uporaba plazme samo moških krvodajalcev v klinične namene in odstranitev levkocitov iz večine krvnih komponent, zelo zmanjšala in v naši ustanovi v zadnjih 10 letih ni bil ugotovljen niti en primer imunske oblike reakcije TRALI.

Literatura

1. Kopko PM. Transfusion reactions, Fifth ed. Maryland: AABB Press Bethesda; 2021. p 165-191, 331-345.
2. Potočnik M, Maček M. Neželene reakcije ob transfuziji s simptomi dihal. Zdrav Vestn 2012; 81 supl 2: II-339-42.
3. John W. Semple, Johan Rebetz, Rick Kapur; Transfusion-associated circulatory overload and transfusion-related acute lung injury. *Blood* 2019; 133 (17): 1840–1853.
4. van den Akker TA, Grimes ZM, Friedman MT. Transfusion-Associated Circulatory Overload and Transfusion-Related Acute Lung Injury. *Am J Clin Pathol.* 2021 Sep 8;156(4):529-539.

Prikaz primera bolnice z nehemolitično vročinsko transfuzijsko reakcijo (NHVTR) in s transfuzijo povzročeno volumsko preobremenitvijo (TACO)

Anja Potnik, Janja Pajk

Transfuzijski center, Splošna bolnišnica Celje, Oblakova ulica 5, 3000 Celje

anja.potnik@sb-celje.si

UVOD

S transfuzijo krvnih komponent lahko nadomestimo različne primanjkljaje sestavin krvi, vendar pri tem obstaja tveganje za neželene transfuzijske reakcije. Pri opredelitvi transfuzijskih reakcij je potrebna previdnost, saj se posamezni simptomi in klinični znaki pojavljajo pri različnih reakcijah.

O nehemolitični vročinski transfuzijski reakciji (NHVTR) govorimo pri telesni temperaturi vsaj 38°C, kadar pride do porasta telesne temperature za vsaj 1°C glede na predtransfuzijske vrednosti. Prisotna je lahko tudi samo mrzlica. Sočasno se lahko pojavijo tudi rdečica obraza, glavobol, slabost. Simptomi navadno nastopijo med transfuzijo ali do 4 ure po transfuziji ob odsotnosti hemolitične transfuzijske reakcije (HTR), bakterijske kontaminacije ali drugega vzroka. Značilna je za bolnike, ki imajo v plazmi levkocitna protitelesa (anti-HLA, anti-HNA) in včasih trombocitno specifična protitelesa, ki reagirajo z levkocitnimi ali trombocitnimi antigeni v krvnih komponentah. Z uvedbo splošne levkodeplecije se je število NHVTR pomembno zmanjšalo. Kljub temu se blage vročinske reakcije še vedno pojavljajo, kar pripisujejo citokinom in drugim molekulam, ki spreminjajo biološki odziv, ki se sproščajo iz preostalih levkocitov v shranjenih komponentah krvi. Večino vročinskih reakcij lahko obvladamo z ustavitvijo transfuzije in dajanjem antipiretikov.

S transfuzijo povzročena volumska preobremenitev (TACO) se lahko pojavi med ali do 12 ur po transfuziji. Za opredelitev je potrebno zadostiti vsaj trem kriterijem; obvezno vsaj enemu (1. ali 2.): 1. na novo nastala dihalna stiska ali poslabšanje, 2. dokazan pljučni edem, 3. dokazane kardiovaskularne spremembe, ki jih ne pojasnijo bolnikove pridružene bolezni, 4. dokazana tekočinska preobremenitev in 5. povišane vrednosti natriuretičnega peptida tipa B (BNP) ali

njegove neaktivne fiziološko stabilnejše oblike (NT-proBNP). Večje tveganje za TACO imajo otroci, starejši od 70 let, bolniki s hudo anemijo, bolniki s srčnim popuščanjem, bolniki z ledvično odpovedjo in postoperativni bolniki. K reakciji TACO pristopimo z ustavitvijo transfuzije, če je možno bolnika namestimo v sedeči položaj, apliciramo kisik in diuretik.

NAMEN

Namen prispevka je prikazati primer 80-letne bolnice z NHVTR in TACO ter predstaviti postopek obravnave prijave transfuzijske reakcije v Transfuzijskem centru (TC) Splošne bolnišnice Celje.

MATERIAL

Avgusta 2023 smo v TC obravnavali prijavo neželene transfuzijske reakcije pri 80-letni bolnici z ne-Hodgkinovim limfomom, sekundarno pancitopenijo in avtoimunsko hemolitično anemijo.

METODE

Gospa ima krvno skupino 0 RhD pozitivno vrednost hemoglobina je bila 62 g/l. V TC smo prejeli naročilo za 3 enote filtriranih koncentriranih eritrocitov (KEF). Zaradi že znanih eritrocitnih aloprotiteles anti-c in avtoprotiteles smo pripravili razširjeno antigensko skladne 0 RhD pozitivne enote eritrocite. Indirektni Coombsov test (ICT) in nazkrižni preizkusi so bili pozitivni, po diluciji 1:10 pa so bili omenjeni testi negativni.

V dveh urah je bolnica v Dnevni bolnišnici (DB) Oddelka za hematologijo in onkologijo prejela dve enoti KEF. Volumna enot sta bila 245 ml in 320 ml. Po polovici transfuzije tretje enote z volumnom 300 ml, 55 minut od pričetka, so se pojavili mrzlica, slabost in bruhanje, bolečine v trebuhu, porast frekvence dihanja (iz 18/min na 40/min), telesne temperature (iz 36,5°C na 38,1°C), krvnega tlaka (iz 164/68 mmHg na 246/132 mmHg), srčne frekvence (iz 81/min na 150/min). Transfuzijo so

ustavili, uvedli so podporno terapijo s kisikom (40% Venturi maska), Adalatom Oros 30 mg, Tavegylom (1 ampula), Solucortefom 100 mg, Torecanom (1 ampula) in paracetamolom 1 g. O transfuzijski reakciji so nas iz DB najprej obvestili po telefonu. Svetovali smo odvzem hemokultur in vzorcev krvi za določitev laboratorijskih kazalnikov hemolize in za ponovitev imunohematoloških preiskav. Prejeli smo tudi izpolnjeno Prilogo III oz. obrazec Prijava neželene reakcije ob transfuziji krvi in kopijo transfuzijskega lista in izdajnice.

REZULTATI

Diferencialno diagnostično je pri NHVTR potrebno izključiti sepsa, hemolitično transfuzijsko reakcijo (HTR) in s transfuzijo povezano akutno poškodbo pljuč (TRALI). Pri TACO pa prav tako TRALI, miokardni infarkt in pljučno embolijo.

V prikazanem primeru so bili kazalniki hemolize negativni, hemoglobin je ustrezno porastel na 103 g/l, ponovljene imunohematološke preiskave so izključile ABO neskladje, z dvakratno aloadsorpcijo smo izključili prisotnost ostalih klinično pomembnih eritrocitnih protiteles. Transfundirane enote so bile razširjeno antigensko skladne. Dve uri po aplikaciji terapije se je klinično stanje pri bolnici normaliziralo, kisik so ukinili do jutra. V naknadnih izvidih smo beležili negativne hemokulture, tudi preostala vsebina vrečke je bila sterilna.

Zaradi takojšnjega pojavljanja znakov in simptomov z življenjsko ogroženostjo smo v štiriindvajsetih urah prijavili hudo neželjeno reakcijo Službi za hemovigilanco (SHV) Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) kot NHVTR. Po prijavi so nam svetovali, da je bolnica razvila verjetno tudi reakcijo TACO, zato smo prijavo ustrezno dopolnili.

Porast telesne temperature, mrzlica, slabost in bruhanje so bili posledica NHVTR. Kot TACO pa smo transfuzijsko reakcijo opredelili zaradi tahipneje, hipertenzije in tahikardije.

Zdravnikom na oddelku smo svetovali, da v prihodnje naročajo največ dve enoti KEF in krvne komponente transfundirajo počasi. Priporočili smo tudi ustrezno premedikacijo pred transfuzijami krvi.

ZAKLJUČEK

V prispevku je predstavljen primer bolnice z NHVTR in TACO. Ocenjujejo, da je incidenca TACO podcenjena (1%). TACO je poleg HTR in TRALI najpogostejši vzrok umrljivosti povezan s transfuzijo. Pri bolnikih s hudo anemijo, kardiovaskularnimi obolenji, ledvično insuficienco, otrocih in starejših je verjetnost pojava TACO večja, zato je potrebna počasna transfuzija. V prikazanem primeru bi bila potrebna počasnejša transfuzija, pri ukrepih ob reakciji pa bi bilo v terapijo potrebno dodati tudi diuretik.

Na TC Celje vsako leto za področje transfuzijske medicine izobražujemo 200 zaposlenih – zdravnikov in medicinskih sester, kar prispeva k boljšemu prepoznavanju in prijavi transfuzijskih reakcij. Ob rednih prijavah neželenih reakcij in dogodkov ocenjujemo, da je sodelovanje s SHV tradicionalno uspešno.

Literatura

1. Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM, eds. Technical Manual. 20th ed. Maryland: AABB; 2020. p. 627-653.
2. Contreras M, Rožman P, Domanović D, ur. ABC transfuzijske medicine. Celje: Celjska Mohorjeva družba; 2015. p. 65-69.
3. De Vries RRP, Faber JC, eds. Hemovigilance: An Effective Tool for Improving Transfusion Safety. West Sussex: Wiley-Blackwell; 2012. p. 355-358.
4. Andrzejewski C, Bolton-Maggs P, Grey S, Land K, Lucero H, et al. Transfusion-associated circulatory overload (TACO): Draft revised reporting criteria. Amsterdam: ISBT; 2017. Available from: <https://www.isbtweb.org/asset/6A93311A-A5A6-43E6-B0656BD1248B8F5C/>

Poročilo Službe za hemovigilanco – leto 2023 v številkah

Aleksandra Bajt, Irena Bricl

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Šljajmerjeva ulica 6, 1000 Ljubljana

aleksandra.bajt@ztm.si

Izvleček

Hemovigilanca se je od svojih začetkov v 90. letih prejšnjega stoletja razvila v natančno definiran sistem, ki spremlja celotno transfuzijsko verigo in izboljšuje njeno varnost. Tri področja delovanja službe za hemovigilanco so: *neželene reakcije pri krvodajalcih*, *neželeni dogodki, povezani z ravnanjem s krvjo* ter *neželene reakcije pri bolnikih*. Vključuje prijavitelje, poročevalce s transfuzijskih centrov in ZTM ter nacionalno Službo za hemovigilanco. Slednja zbira in analizira hemovigilančne podatke za vso Slovenijo, o vseh *hudih neželenih dogodkih in reakcijah* nemudoma obvešča JAZMP ter pripravlja letna poročila. Ena izmed oblik letnega hemovigilančnega poročila je pred vami – Leto 2023 v številkah.

Abstract

Since its beginnings in the 1990s, hemovigilance has developed into a well-defined system that monitors the entire transfusion chain and improves its safety. Three main areas of activity are: *adverse reactions in blood donors*, *adverse events related to blood handling*, and *adverse reactions in patients*. It includes notifiers, i.e. doctors and other health workers, reporters from hospital blood bank and transfusion centers, as well as the National Hemovigilance Service. The latter is an organizational unit of the Blood Transfusion Centre of Slovenia (ZTM) that collects and analyzes national hemovigilance data, immediately informs Agency for Medicinal Products and Medical Devices of the Republic of Slovenia (JAZMP) about all *serious adverse events and reactions* and

prepares annual hemovigilance reports. One of its forms is in front of you - The Year 2023 in Numbers.

Uvod

Termin hemovigilanca izhaja iz grške besede za kri '*haema*' in latinske besede '*vigilans*', ki pomeni pozoren, čuječ. Od svojih začetkov v zgodnjih devetdesetih letih prejšnjega stoletja v Franciji se je hemovigilanca postopoma razvila iz koncepta varnosti krvi, osredotočenega na spremljanje neželenih reakcij in dogodkov pri bolnikih, v natančno definiran sistem, ki spremlja celotno transfuzijsko verigo in izboljšuje njeno varnost. Sistem hemovigilance v nekaterih zahodnih državah deluje že 30 let, v Sloveniji pa od leta 2002. Zajema tri področja delovanja: *neželene reakcije pri krvodajalcih ob odvzemu krvi, neželene dogodke, povezane z ravnanjem s krvjo ter neželene reakcije pri bolnikih ob transfuziji krvi*. Vključuje **prijavitelje**, torej zdravnike in druge zdravstvene delavce, **poročevalce** iz bolnišnične krvne banke, transfuzijskih centrov in Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) ter nacionalno **Službo za hemovigilanco**, ki je organizacijska enota ZTM. Slednja ažurno obvešča **Javno agencijo Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke** (JAZMP) o vseh *hudih neželenih dogodkih v zvezi z zbiranjem, testiranjem, predelavo, shranjevanjem, razdeljevanjem in uporabo krvi ter komponent krvi (KK)*, ki utegnejo vplivati na njihovo kakovost in varnost, kakor tudi o vseh *hudih neželenih reakcijah med transfuzijo ali po njej*, ki jih je mogoče pripisati kakovosti in varnosti krvi ter KK. Služba za hemovigilanco pripravi letno poročilo o hudih neželenih dogodkih in reakcijah preteklega leta do 1. marca, JAZMP pa ga po pregledu najkasneje do 30. junija posreduje Ministrstvu za zdravje in Evropski komisiji.

Krvodajalstvo

V letu 2023 so slovenske transfuzijske ustanove skupaj opravile 86.210 odvzemov pri krvodajalcih, od teh je bilo 7.624 novih krvodajalcev (8,8 %). Izdale so 102.259 enot KK: 79.809 enot koncentriranih eritrocitov (KEF), 11.323 enot sveže zmrznjene plazme (SZP) in 11.127 enot trombocitnih pripravkov (TP). Slednji so večinoma pripravljene z zlitjem trombocitno-levkocitih plasti petih darovalcev ali pa so pridobljeni od enega darovalca s postopkom afereze. Lani je bilo izdanih 11.127 TP: 9.802 oz. 88,1 % pripravkov trombocitnih zlitij in 1.325 oz. 11,9 % afereznih TP.

Vsako enoto krvi in vsako z afereznim postopkom zbrano KK presejalno testiramo na označevalce s krvjo prenosljivih okužb: hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV), HIV in sifilis. S serološkim testiranjem zaznavamo antigene in/ali protitelesa proti virusom HIV, HBV, HCV ter protitelesa proti *Treponemi pallidum*. S testiranjem NAT (*angl.* Nucleic Acid Testing) testiramo vzorce krvodajalcev na prisotnost HIV in HCV RNK ter HBV DNK. Leta 2023 smo s presejalnim testiranjem odkrili 8 krvodajalcev z okužbo, od teh jih je 5 darovalo kri prvič. Pri 3 smo potrdili okužbo s sifilisom, pri 1 pa okužbo s HCV. V krvi 4 krvodajalcev smo dokazali prisotnost HBV DNA, od teh sta imela 2 prisoten tudi HBsAg, druga 2 pa sodita v skupino oseb z okultno okužbo s HBV (*angl.* Occult Hepatitis B Virus Infection, OBI). Od novembra 2022 so trajno odklonjeni krvodajalci, pri katerih ugotovimo prisotnost protiteles anti-HBc, za 4 mesece pa odklanjamo vse tiste krvodajalce, ki so bili v stiku s partnerjem ali živijo v istem gospodinjstvu z osebo, ki ima akutni ali kronični hepatitis B.

Vsaki zbrani KK določimo krvno skupino (KS) ABO in RhD, pri prvih in drugih odvzemih še antigen K in fenotip Rh. Vedno naredimo tudi indirektni Coombsov test (ICT). V letu 2023 smo pri 117 krvodajalcih odkrili prvič pozitiven ICT in pri 113 krvodajalcih prvič pozitiven direktni Coombsov test (DCT). Krvni krvodajalcev s pozitivnim ICT ne uporabimo za zdravljenje bolnikov ali za izdelavo zdravil iz krvi. Po ugotovljenem pozitivnem DCT izločimo le KEF, SZP in TP pa so primerni za klinično uporabo.

Reakcije pri krvodajalcih

Leta 2023 smo beležili 1.337 neželenih reakcij in dogodkov pri krvodajalcih ob odvzemih polne krvi ali pri odvzemih KK z afereznimi postopki. Med generaliziranimi reakcijami je bilo največ vazovagalnih reakcij (824), sledijo jim citratne reakcije (335), ki so zaplet afereznih postopkov. Izmed 178 lokaliziranih reakcij je bilo največ hematomov (171).

JAZMP je bilo v letu 2023 kot *hud neželen dogodek* prijavljenih 24 hudih reakcij pri zbiranju polne krvi. V večini primerov je šlo za vazovagalne reakcije z izgubami zavesti in konvulzijami ter padci z ali brez poškodb ali pa s podaljšanim obdobjem slabosti, ki so zahtevali napotitev v drugo ustanovo. Kot hud neželen dogodek smo označili 1 primer poškodbe živca ob darovanju krvi. Število 15,51 prijavljene reakcije na 1.000 odvzemov je primerljivo s števili v letih pred 2022 in odraža vestno beleženje neželenih reakcij pri darovanju krvi in KK.

Neželene transfuzijske reakcije pri bolnikih

V skladu z veljavno zakonodajo je potrebno vsako reakcijo na transfundirano KK prijaviti transfuzijski službi. Postopek je opisan v **Pravilniku o hemovigilanci**. Lečeči zdravnik izpolni **obrazec 'Prijava neželene reakcije ob transfuziji krvi'**, ki vsebuje splošne podatke bolnika, bolnišnice in oddelka, zdravnika prijavitelja ter podatke o reakciji. Navesti je potrebno tudi stopnjo ogroženosti bolnika in stopnjo povezanosti reakcije s transfuzijo. Izpolnjen obrazec se pošlje skupaj s potransfuzijskim vzorcem krvi in ostankom enote transfundirane KK na transfuzijsko ustanovo, kjer je bila le-ta izdana. Na podlagi prijave in po potrebi posveta z lečečim zdravnikom se transfuziolog odloči o nadaljnjih ukrepih in preiskavah ter izpolni **poročilo o neželeni transfuzijski reakciji**. V primeru določenih vrst neželenih transfuzijskih reakcij, katerekoli življenje ogrožajoče reakcije ali smrti bolnika je potrebno poročilo o reakciji čim prej posredovati Službi za hemovigilanco, ta pa dalje prijavo **hude neželene reakcije** na ustreznem obrazcu JAZMP. Služba za hemovigilanco po zaključku analize hude neželene reakcije pošlje JAZMP še potrditveni obrazec, lečečemu zdravniku pa mnenje o izsledkih. Huda neželena reakcija je definirana kot z

odvzemom ali transfuzijo krvi oziroma KK povezan nehoten odziv pri krvodajalcu ali bolniku, ki je lahko smrten, smrtno nevaren, ki povzroča stanje invalidnosti ali nezmožnosti za delo, ali ima za posledico hospitalizacijo ali zbolewnost oziroma podaljšanje le-teh.

Leta 2023 je bilo v Sloveniji prijavljenih 87 neželenih transfuzijskih reakcij pri bolnikih, od tega smo jih 80 potrdili. Osemdeset reakcij na 1.000 izdanih enot KK znaša 0,78 reakcije. Številka je sicer malce višja kot prejšnje leto, vendar število prijav v večini transfuzijskih ustanov pada, verjetno na račun manjšega prijavljanja blagih reakcij, ki ostajajo bodisi neopažene bodisi se jih bolnišničnemu osebju ne zdi smiselno prijavljati. Kot vsa leta doslej so bile najpogostejše neželene transfuzijske reakcije *vročinske nehemolitične reakcije (FNHTR) in alergijske reakcije*.

Na tretjem mestu sledi z 11 primeri najpogostejša respiracijska neželena transfuzijska reakcija, *s transfuzijo povezana volumska preobremenitev (angl. Transfusion-Associated Circulatory Overload, TACO)*, ki je v zadnjem desetletju v večini zahodnih držav z razvito transfuzijsko službo tudi najpogostejši vzrok za s transfuzijo povezanimi zbolewnostjo in umrljivostjo. Tudi pri nas gre za najpogostejšo hudo neželeno transfuzijsko reakcijo, ki jo je vedno potrebno prijaviti JAZMP. Za preprečevanje nastanka TACO je bistvenega pomena prepoznavanje bolnikov z dejavniki tveganja, kot so starost nad 70 let in manj od 3 let, srčno popuščanje, ledvična bolezen, pozitivna bilanca tekočin, stanje po operativnih posegih itd. Pri ogroženih bolnikih je potrebno prilagoditi hitrost transfuzije in oceniti ustrezen volumen KK ter po presoji predpisati diuretik Henlejeve zanke. Prejeli smo 4 prijave suma na drugo respiracijsko neželeno transfuzijsko reakcijo, na *s transfuzijo povezano akutno poškodbo pljuč (angl. Transfusion-Related Acute Lung Injury, TRALI)*. Po analizi so se vse izkazale za TACO. Potrdili smo 2 primera tretje respiracijske transfuzijske reakcije, *s transfuzijo povezane dispneje (angl. Transfusion-Associated Dyspnea, TAD)*. Za to diagnozo se odločimo, ko se pojavi respiracijska simptomatika med ali znotraj 24 ur po transfuziji, niso pa izpolnjeni kriteriji za TACO ali TRALI. V letu 2023 je bilo JAZMP prijavljenih skupno 18 neželenih transfuzijskih reakcij, od tega 17 potrjenih. Poleg navedenih respiracijskih transfuzijskih reakcij smo obravnavali še po 2 primera *anafilaktične reakcije* in *hemolitične reakcije* ter 1 primer hude *hipotenzivne transfuzijske reakcije*. Potrjena blaga hemolitična reakcija je nastopila po transfuziji antigensko neskladnih enot KEF, naročenih s stopnjo nujnosti zelo nujno (1. faza po telefonu),

pred ugotovitvijo na novo prisotnih aloprotiteles anti-Jk(b). Kot v vseh dosedanjih letih, tudi lani nismo zabeležili smrtnega primera zaradi transfuzije KK, vsi navedeni primeri so se razrešili brez trajnih posledic. Druga prijava hemolitične reakcije zaradi ABO neskladne transfuzije je bila obravnavana sočasno kot hud neželen dogodek. V operacijski dvorani so za bolnika s KS 0, RhD neg., Du poz. naročili KEF s stopnjo nujnosti zelo nujno (1. faza po telefonu), nato pa mu – brez preverjanja podatkov po telefonu z laboratorijskim inženirjem – transfundirali 2 enoti A, RhD poz. KEF, namenjenih drugi bolnici. Bolnik je umrl zaradi kirurško nerešljivih zapletov osnovne bolezni.

V Sloveniji smo leta 2023 pri 590 bolnikih na novo odkrili bodisi protitelesa proti posameznim eritrocitnim antigenom bodisi protitelesa nerazvidne specifičnosti. Med novimi senzibilizacijami je bilo zabeleženih največ aloprotiteles anti-E (148), anti-M (103), anti-K (46), anti-D (45) in anti-Jk(a) (36). Poleg teh je imelo 75 bolnikov hkrati prisotnih več aloprotiteles, pri 66 pa smo ugotavljali prisotnost avtoprotiteles.

Neželeni dogodki

Neželeni dogodki so vsi dogodki, povezani z ravnanjem s krvjo, od zbiranja, predelave, testiranja in izdaje krvi, pa do ravnanja s krvjo na bolnišničnih oddelkih. V sistem hemovigilance neželenih dogodkov so torej vključeni vsi, ki na kakršenkoli način rokujejo z vzorci krvi za predtransfuzijske preiskave, s KK in spremno dokumentacijo. Zaradi širokega področja delovanja je beleženje neželenih dogodkov zahtevno, klasifikacija kompleksna, na voljo ni niti ustreznega prijavnega obrazca. Tako ostanejo neželeni dogodki pogosto neprijavljeni in statistika prijav po letih zelo niha.

Pravi neželeni dogodki so tisti, ko napako spregledamo in vpliva na transfuzijo. V 4 primerih je bila transfundirana napačna komponenta, v 5 pa komponenta, ki ni ustrezala zahtevam. V vseh 4 primerih transfundiranih napačnih komponent je šlo za transfuzijo enot KEF, ki so bile izdane za drugega bolnika. Pri 2 od teh primerov je prišlo do zamenjave bolnikov z identično KS že ob izdaji enot KEF na ZTM, ki je v bolnišnici niso opazili in enote KEF brez ustreznega preverjanja

transfundirali. Beležili smo 4 izdaje antigensko neustreznih enot KEF in enkrat spregledali oznako na naročilnici in opombo v informacijskem sistemu, da je za bolnika potrebno izdajati CMV negativno kri. V enem primeru izdaje antigensko neustrezne enote na naročilo s stopnjo nujnosti zelo nujno (1. faza po telefonu) je bila prav tako spregledana opomba v informacijskem sistemu, ki pri bolniku označuje prisotnost aloprotiteles anti-S. V 18 primerih smo zaznali napačno ravnanje s krvjo izven transfuzijskega centra.

V drugi skupini neželenih dogodkov so **skorajšnje napake** (*angl.* 'Near Miss'), torej pravočasno ugotovljene napake, pri katerih smo neustrezno transfuzijo preprečili. Leta 2023 je bilo zabeleženih 737 skorajšnjih napak. Med njimi je bilo največ napačno izpolnjenih naročilnic za KK in transfuzijske preiskave (304) ter napačno orientacijsko določenih KS ABO na bolnišničnih oddelkih (254). Priporočena orientacijska določitev KS na ploščici je del identifikacije bolnika in eno od zagotovil, da je bil vzorec za predtransfuzijske preiskave odvzet pravemu bolniku. Zakonsko obvezna je orientacijska določitev KS bolnika (*angl.* Bedside Test) pred vsako transfuzijo, s čimer lahko preprečimo transfuzijo ABO neskladne krvi. V lanskem letu smo namreč zabeležili 17 primerov *napačne krvi v epruveti* (*angl.* Wrong Blood in Tube, WBIT). To pomeni, da je bila kri za transfuzijske preiskave odvzeta enemu bolniku, epruveta s krvjo pa opremljena z matičnimi podatki drugega.

Zaključek

V svetu in pri nas so kratko zgodovino hemovigilance zaznamovale številne uspešne pobude, ki so izboljšale varnost transfuzije. Poleg obravnave dobro znanih tveganj je hemovigilanca zaznala nekatera prej neprepoznana tveganja in postala gonilna sila pri spreminjanju politik, predlaganju smernic in implementiranju novih praks ter zagotavljanju izobraževanja.

Literatura

1. de Vries RRP, Faber JC, Strengers PFW, Members of the Board of IHN. Haemovigilance: an effective tool for improving transfusion practice. *Vox sang.* 2011;100(1):60-67
2. Marić I, Bricl I. Hemovigilanca – poročilo Službe za hemovigilanco 2020. *Isis.* 2021;11:48-50
3. Marić I. Hemovigilanca - poročilo Službe za hemovigilanco 2021. *Isis.* 2023;1:40-42
4. Marić I, Bajt A. Hemovigilanca – poročilo Službe za hemovigilanco 2022. *Isis.* 2023;12:44-46
5. Vuk T, Politis C, Laspina S, Lozano M, Haddad A, de Angelis V, Garrad O, EMITm group. Thirty Years of Hemovigilance – Achievements and Future Perspectives. *Transfus Clin Biol.* 2023;30:166-172
6. Potočnik M. Hemovigilanca in varna transfuzija krvi. *Zdrav Vestn.* 2004;73:81-84
7. Mukherjee S, Maiti R. Hemovigilance: A Current Update in Indian Perspective. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(11):5-9

Preskrba s krvjo (ZTMS)

Sprememba EU zakonodaje: Uredba

Irena Razboršek

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

irena.razborsek@ztm.com

Uredba Evropskega parlamenta in sveta o standardih kakovosti in varnosti za snovi človeškega izvora (SČI), namenjenih za uporabo na ljudeh, ter o razveljavitvi direktiv 2002/98/ES in 2004/23/ES.

1. Uvod

Večletno intenzivno delo na posodobitvi evropske zakonodaje (direktiv), ki so ločeno obravnavale kri in ločeno tkiva in celice, je pripeljalo do priprave Uredbe (Regulation), ki vključuje vse SČI in pokriva vse postopke/aktivnosti v zvezi z njimi. Ključne izboljšave so pri zaščiti darovalcev in potomcev rojenih z oploditvijo z medicinsko pomočjo, harmonizaciji med državami članicami, ki bo omogočila izmenjavo SČI med državami in tako izboljšala dostopnost terapij za paciente, pri vzpostavitvi pogojev za varne, učinkovite in dostopne inovacije, pri pripravljenosti v kriznih situacijah, uvedbi skupne digitalne platforme, pri vključevanju ostalih darovanih SČI (npr. darovano materino mleko, mikrobiota) in pri podpori visokih standardov varnosti in kakovosti na podlagi najnovejših strokovnih dognanj.

2. Področje uporabe

Uredba pokriva vse postopke pri vseh SČI, razen kadar je priprava ali aplikacija obravnavana v drugi evropski zakonodaji s področja farmacije ali medicinskih pripomočkov.

3. Dejavnosti/postopki v zvezi s SČI, subjekti in ustanove za SČI

Uredba pokriva vse postopke v zvezi z darovanjem, obdelavo, testiranjem, shranjevanjem, sproščanjem v uporabo, distribucijo, uvozom in izvozom ter aplikacijo pacientu ter klinični učinek pri njem.

Uredba poleg ustanove (establishment) uvaja tudi subjekt (entity). Glede na aktivnosti v zvezi s SČI, ki jih izvajajo, sledijo postopki registracije, avtorizacije in redne inšpekcije.

Subjekt izvaja eno ali več aktivnosti/postopkov s SČI. V vsakem primeru mora biti registriran. Ustanova za SČI izvaja **vsaj** predelavo in shranjevanje **ali** sproščanje **ali** uvoz **ali** izvoz. Mora biti registriran, avtoriziran in redno pregledovan (inšpekcije). Ostaja pozicija odgovorne oseba, kot jo že poznamo do sedaj, poleg tega pa še oseba odgovorna za sproščanje SČI in imenovan zdravnik. Za subjekt, ki izvaja uvoz so dodatne zahteve za avtorizacijo.

4. Priprava SČI in njihova avtorizacija

Priprava/predelava SČI, kot na primer priprava komponent krvi iz polne krvi, podlaga za avtorizacija je korist za pacienta na oceni tveganja, ki jo lahko izkazujemo na podlagi izpolnjevanje standardov (npr. EDQM), dokumentacije o validaciji, drugih podatki o varnosti, kakovosti in učinkovitosti in če je potrebno, se pripravi tudi načrt spremljanja klinične učinkovitosti sorazmeren tveganju pri uporabi SČI. Vlogo oceni nadzorstveni organ, ki se na podlagi podatkov odloči o podelitvi avtorizacije.

5. Standardi in hierarhija tehničnih navodil

Subjekti SČI morajo slediti najvišjim standardom, ki so na voljo. Nivo 1 predstavlja evropsko zakone. Če posebnega zakonskega akti ni, potem se upoštevajo tehnični standardi, ki bodo na razpolago na EU SoHO Platformi, kot npr. monografija EDQM, tehnični standardi ECDC ali navedenim ekvivalentni standardi. Če tudi teh ni na voljo, se upoštevajo druga navodila, ki temeljijo na mednarodnih standardih ali strokovnih dokazih.

6. Zaščita darovalcev in varovanje

Z Uredbo se krepí zaščita darovalcev pred, med in po darovanju, prav tako se krepí zaščita dostojanstva in celovitost preminulih darovalcev. Poudarek je na prostovoljnem in neplačanem darovanju, brez finančne spodbude. Če država članica dovoljuje kompenzacijo, mora v nacionalni zakonodaji določiti zgornjo mejo za kompenzacijo in pogoje deliti z ostalimi državami.

7. Vigilanca

Postopki ostajajo enaki, kot so bili do sedaj. Prijava in spremljanje hudi neželenih učinkov in dogodkov.

8. Zagotovljena preskrba s SČI

Uvaja se termin Kritična SČI – kadar bi pomanjkanje imelo za posledico hudo škodo ali tveganje zanjo pri pacientu ali pa resno prekinitev proizvodnje kritičnih produktov, ki jih ureja druga zakonodaja (zdravila iz krvi). Zato je vsaka država dolžna poskrbeti za zadostno in kontinuirano oskrbo, vzpodbujati darovanje, prav tako optimalno uporabo in imeti pripravljen načrt ukrepanja v izrednih razmerah.

9. Digitalizacija – Platforma SOHO

Digitalizacija bo doprinesla h učinkovitosti, preglednosti in spremljanju. Registracija vseh subjektov SČI in njihova avtorizacija bo potekala preko Platforme, objavljeni bodo kompendiji, seznamí potekajočih kliničnih študij, dostopna bo odbor (SoHO Coordination Board), ki bo vedno na voljo za nasvete, tu bodo objavljeni vsa nujna obvestila, informacije o pomankanju SČI, tehnični standardi in seznam nadzorstvenih organov.

10. Zaključek

Uredba, dostopna na spletni strani Evropske komisije, je v postopku pregleda pravnikov jezikoslovcev. Uredba mora biti najprej prevedena v vse jezike držav Evropske unije. V veljavo stopi v 20 dneh po sprejetju /odobritvi s strani Evropskega parlamenta in objavi v Uradnem listu Evropske unije. To se pričakuje v letu 2024 še v tej sestavi parlamenta. Uredba se ne implementira v nacionalne zakonodaje, ampak stopi neposredno v veljavo v državi članici. Določeno je obdobje 3 let (do 2027) da določbe Uredbe postanejo veljavne. Lahko pa se države članice za določena področja odločijo za bolj strogo ureditev, ki jo opredelijo v nacionalnih aktih. Uredba daje podlago, naloga državam članic pa je, da poskrbijo za neplačano, prostovoljno darovanje in da naredijo vse, kar je v njihovi moči, da dosežejo samooskrbo. Lahko promovirajo neplačano, prostovoljno darovanje, ni pa dovoljeno oglaševanje, ki bi bilo nepošteno, zavajajoče ter za pridobitno plačilo.

Literatura:

1. Monografija na internetu: European Commission, Public Health [cited 2024 Apr 2].

Available from: <https://health.ec.europa.eu/>

Predstavitev EU projekta SUPPLY (Strengthening voluntary non-remunerated plasma collection capacity in Europe)

Polonca Mali

Zavod RS za transfuzijsko medicino

polonca.mali@ztm.si

Projekt SUPPLY (**Strengthening voluntary non-remunerated plasma collection capacity in Europe**) je projekt, sofinanciran s strani EU, ustanovljen z namenom preučitve stanja in priprave priporočil za Krepitev zmogljivosti prostovoljnega neplačanega zbiranja plazme v Evropi.

V projektu je sodelovalo 19 partnerjev, različnih nacionalnih in regionalnih transfuzijskih ustanov in služb iz držav članic Evropske unije in Velike Britanije, nadzorstvene agencije, ne-profitni predelovalci plazme, zdravstveno osebje in krvodajalci. Vodenje in delo koordinacije je prevzelo Evropsko Združenje transfuzijskih ustanov (European Blood Alliance). Projekt je trajal 18 mesecev (september 2022-februar 2024).

Namen projekta je bil pregledati prakse in izvajanje procesa zbiranja plazme v Evropi, predvsem pa:

- oblikovati priporočila za razvoj predloga skupnih politik EU (ali tudi pravnih okvirov), namenjenih podpori nacionalnih prizadevanj in prizadevanj EU za doseganje višje stopnje strateške neodvisnosti od virov zunaj EU pri zbiranju plazme in njenem frakcioniranju

(pripravi in predelavi) v zdravila iz krvi (plasma -derived medicinal products-PDMP),

- zagotoviti na dokazih temelječa priporočila in orodja za izvajanje najboljših praks glede (neplačanega) pridobivanja in stalnosti darovalcev plazme,

- razviti nabor priporočil, ki bodo podprla razširjene in izboljšane programe zbiranja plazme s strani podjetij po vsej Evropi in bodo na koncu okrepila odpornost zbiranja plazme med krizo;

- razviti priporočila za prakse zaščite darovalcev plazme, ki temeljijo na dokazih,

- pripraviti navodila in priporočila o ustrezni uporabi PDMP na začetku in o njegovi prednostni razvrstitvi v času krize.

Velik del odvzema plazme v EU izvajajo neprofitne transfuzijske ustanove (TU) od prostovoljnih neplačanih darovalcev, vendar odvzemi ne dosegajo potrebnih količin za popolno samooskrbnost in zagotovitev strateške neodvisnosti na evropski ravni, še posebno pa za oskrbo bolnikov v posameznih članicah. Projekt se je osredotočil na to, kako lahko posamezne TU izboljšajo in zgradijo programe zbiranja plazme brez plačila za darovanje

(princip prostovoljnosti in neplačljivosti darovalca) in jih naredijo učinkovitejše. Poudarek je bil tudi na ohranjanju varnosti darovalcev na način, ki koristi zdravju darovalcev, pa tudi na pridobivanju kakovostne plazme, potrebne za proizvodnjo zdravil iz plazme.

Konzorcij projekta SUPPLY je odličen primer solidarnosti: številne zainteresirane strani iz različnih držav članic so sodelovale in sodelujejo pri izboljšanju življenja državljanov EU. Projekt SUPPLY je svoje številne rezultate, vključno s poročili, orodji in dokumenti o stališčih objavil na spletnem mestu: <https://supply-project.eu/>.

SUPPORT-E Project

Dragoslav Domanović

European Blood Alliance, Amsterdam, Nizozemska

d.domanovic@europeanbloodalliance.eu

Very early in the pandemic, the plasma collected from donors recovered from COVID-19 has been used to treat patients with COVID-19 but has yielded controversial clinical results. Thus, COVID-19 convalescent plasma (CCP) required extensive investigation of product characteristics and clinical efficacy. In this regard, the EU-funded project named SUPPORT-E was established to support high-quality clinical and scientific evaluation of the use of CCP for treating patients during the COVID-19 pandemic, achieve a consensus on the appropriate use of CCP in the treatment of COVID-19 across EU Member States, and promote best practices regarding convalescent plasma use in the current health crisis as well as in subsequent crises involving novel pathogens. The ultimate goal of the project is to develop harmonised evidence-based recommendations for such treatments.

The SUPPORT-E Consortium is composed of 12 partners representing blood establishments and national competent authorities and the European Blood Alliance. The project is carried out by seven Work Packages (WP). The two-year project started on 01 July 2020 and has been extended twice, so the current project completion date is 31 December 2025. At the time of this report, the working groups addressed the project's objectives.

WP 1 assessed available literature, produced preliminary assessment criteria and guidelines for clinical trials or monitored access programs and continuously followed ongoing clinical trials. WP 2 analysed the EU-CCP database regarding data quality and the number, structure, and completeness of the datasets. It also supports the multicentre clinical trial named COVIC-19 that investigates the efficacy of early transfusion of very high Ab titre CCP in vulnerable immunocompromised COVID-19 patients. WP3 provides valuable insights through the monitoring

and analysis of the EU CCP database. WP4 produced standards for biochemical (BCH) and virus neutralization (VN) assays, in CCP donors and products. It demonstrated the linearity of different BCH and VN assays and showed the correlation between VN and BCH assays as well as the effect of vaccinations and virus variants on this correlation. WP 5 integrated project-generated data, calculated CCP provision costs in the EU, performed a SWOT analysis of CP use during a pandemic, and formulated recommendations for future CP collection and use. WP 6 contributed to the project publications and press releases, prepared layman versions of the technical reports, organised meetings and a final meeting-stakeholder conference, interacted with parallel projects and conducted a dialogue with the EU. WP7 managed and coordinated the project.

The unexpected decline in COVID-19 cases and the absence of a new wave in the last quarter of 2023 resulted in a low accrual rate in the COVIC-19 study, which, together with the DSMB recommendation, led to its conclusion. The SUPPORT-E project consortium concluded that the termination COVIC-19 trial would have implications for the project's duration and may end the project before the approved deadline. The final estimate of the duration of the project depends on the availability of study results and inclusion in the project recommendations but is expected to be by the end of 2024.

www.support-e.eu

Rezultati ankete zadovoljstva med krvodajalci SV Slovenija

Liona Rebernik¹, Biserka Dvoršič¹

¹Center za transfuzijsko medicine Maribor

liona.rebernik@ukc-mb.si

UVOD

Krvodajalstvo sodi med najvišje altruistično dejanje, od katerega je odvisno nemoteno delovanje zdravstva in zdravljenje bolnikov. Gre za najvišjo obliko pomoči med ljudmi, saj krvodajalci v Sloveniji kri darujejo za neznanca, prostovoljno in brez plačila. Zahteva vse aktivnosti motiviranja, obveščanja, organiziranja, izobraževanja in pozivanja krvodajalcev na krvodajalske akcije za zagotavljanje nacionalne samozadostnosti. V Sloveniji potrebujemo v povprečju med 300 in 350 krvodajalcev dnevno, da zadostimo potrebam po krvi.

NAMEN

Namen ankete je bil preveriti splošno zadovoljstvo krvodajalcev z delovanjem in dostopnostjo transfuzijskih ustanov SV Slovenije ter zbrati njihove morebitne predloge za izboljšanje našega dela z namenom, da se jim približamo in jih obdržimo v sistemu krvodajalstva.

METODE

Anketo zadovoljstva med krvodajalci smo izvajali 3 tedne, od 4.12. do 22.12.2023, na štirih lokacijah, in sicer na Centru za transfuzijsko medicino Maribor (CTM), terenskih krvodajalskih akcijah (TKA), enoti transfuzijske dejavnosti (ETD) Ptuj in ETD Murska Sobota. Skupaj smo zbrali 1103 anket, od tega 329 (29,8%) iz CTM, 332(30,1%) TKA, 237(21,5%) iz ETD Ptuj in 205 (18,6%) ETD Murska Sobota.

Anketa je vsebovala 6 vprašanj izbirnega tipa in eno opisno, kjer so nas zanimali morebitni individualni predlogi za izboljšave v zvezi z našim delom. Dobljene podatke smo prešteli ter statistično obdelali in vizualizirali s pomočjo računalniškega programa Microsoft Office Excel. Ankete na vseh štirih lokacijah so imela enaka vprašanja, le drugo vprašanje je bilo nekoliko spremenjeno glede na različne lokacije anketirancev.

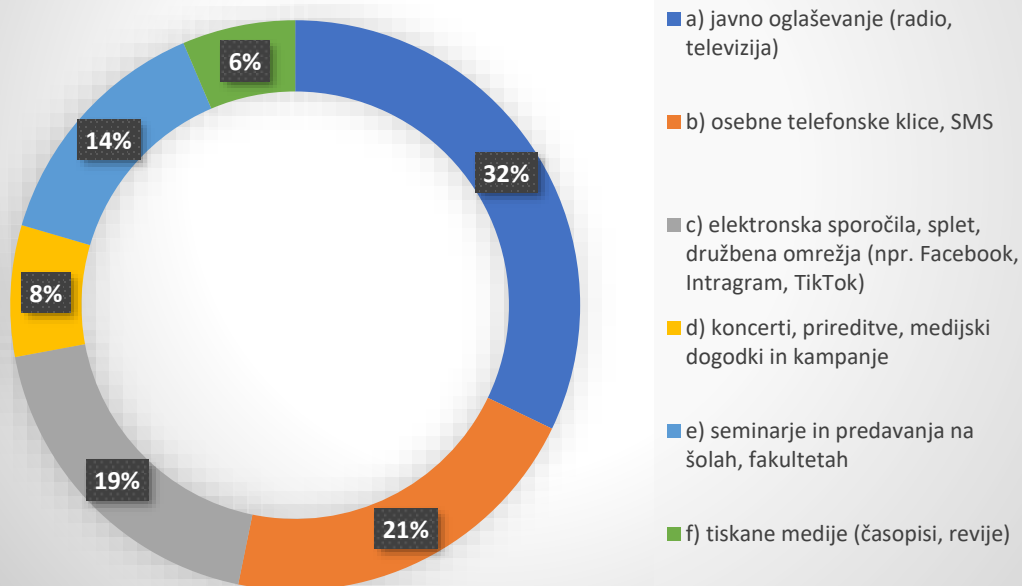
REZULTATI

Na začetku nas je zanimalo, kje so bili krvodajalci seznanjeni s pomenom, namenom in načinom delovanja krvodajalstva, in ali so se potem odločili za to plemenito dejanje. Iz ankete lahko sklepamo, da so prav krvodajalci sami najboljši promotorji krvodajalstva, saj je kar 46,1% anketiranih za krvodajalstvo izvedelo od prijatelja ali sorodnika krvodajalca. 14,1% krvodajalcev je za krvodajalstvo izvedelo iz družabnih omrežij (Facebook, Instagram, TikTok...).

Pri drugem vprašanju nas je zanimalo, ali so zadovoljni s časom odvzemov krvi. Tukaj so se vprašanja med posameznimi lokacijami anketiranih razlikovala zaradi že obstoječih različnih časov odvzemov, organiziranih v skladu z dosedanja prakso porabe krvi in enakomerno tedensko razporejenostjo med lokacijami. Na vseh štirih lokacijah so anketiranci želeli predvsem podaljšane ure odvzema med delovniki, najbolj ob petkih.

Z namenom povečanja števila baze krvodajalcev in hkrati s ciljem približati krvodajalstvo predvsem mlajši populaciji ljudi, nas je zanimalo mnenje krvodajalcev glede tega, katere ukrepe bi po njihovem mnenju lahko najučinkoviteje uporabili za pospeševanje prostovoljnega, neplačanega dajanja krvi.

Katere ukrepe bi lahko po Vašem mnenju lahko najučinkoviteje uporabili za pospeševanje prostovoljnega, neplačanega dajanja krvi?



Graf 1: mnenja glede ukrepov za najbolj učinkovito pospeševanja prostovoljnega, neplačanega krvodajalstva

Še vedno je večina krvodajalcev (32%) mnenja, da je javno oglaševanje preko radia in televizije ter osebno kontaktiranje preko telefonskih klicev in SMS sporočil (21%) najbolj učinkovit način približevanja in motiviranja za nadaljno darovanje krvi. Sledi jim oglaševanje preko elektronskih sporočil, spleta in družabnih omrežij (19%) in nato kontakt preko šol (14%). Tiskani mediji in oglaševanje na prireditvah so se krvodajalcem zdeli najmanj učinkoviti.

Za namen vzdrževanja in iskanja strategij motiviranja krvodajalstva nas je zanimalo, kaj krvodajalce najbolj spodbudi, da kri ponovno darujejo.



Graf 2: prikaz mnenja, kakšne vzpodbude za darovanje krvi bi bile sprejemljive za krvodajalce

Iz rezultatov ankete lahko sklepamo, da je za krvodajalce še vedno največja motivacija za ponovno darovanje krvi dela prost dan, in sicer v 54,4%, kot ga imamo v Sloveniji.

Zanimalo nas je tudi, kako so krvodajalci zadovoljni s posameznimi koraki pri darovanju, od naročanja, sprejema do odvzema, z malico ter osebjem. Krvodajalci so v povprečju 98% zadovoljni z vsemi koraki ob darovanju krvi, kar kaže na dobro delo celotne transfuzijske ekipe.

Pri opisnem vprašanju, kjer smo spraševali po konkretnih predlogih za izboljšanje našega dela, jih je odgovorilo 21,9%, polovica od teh jih je pisno navajala le pohvale našega dela in odnosa. Nekaj predlogov je bilo za izboljšanje pri posameznih aspektih dela (vegetarijanska malica, več akcij, več parkirišč, brez naročanja...) ali predlogih za ugodnosti krvodajalcev v zdravstvenem sistemu (prednostna obravnava) ali dva dela prosta dneva.

DISKUSIJA IN ZAKLJUČEK

Krvodajalci so pomemben del zdravstvenega sistema, saj našim bolnikom omogočajo ustrezno zdravljenje s krvjo in komponentami krvi. Trudimo se, da ostanemo samozadostni. Zato je zelo pomembno, da so krvodajalci ob darovanju krvi zadovoljni, da jim znamo prisluhniti, da se jim približamo bodisi s podaljšanjem časa odvzemov krvi bodisi z različnimi drugimi motivatorji. Tako se približamo življenjskemu stilu krvodajalcev, ki bodo tako večkrat prišli k nam. Že Bani in sodelavci so v svoji raziskavi ugotovili, da so prav krvodajalci sami največji motivatorji za privabljanje novih krvodajalcev in motiviranje znotraj družine. Tudi naši krvodajalci so največjo spodbudo dobili prav od prijatelja ali sorodnika krvodajalca. Zelo je pomemben tudi osebni nagovor krvodajalca ter odgovor na morebitna vprašanja, nejasnosti v zvezi z darovanjem krvi. Kot zdravstveni delavci s področja transfuzijske dejavnosti se moramo zavedati, da moramo tudi sami širiti kakovostne in preverjene informacije posameznikom, ki se za prvo darovanje morda še vedno odločajo.

Na CTM Maribor se trudimo povečati število predvsem mlajših krvodajalcev in hkrati obdržati že obstoječe. Za najboljšo strategijo približevanja krvodajalstva se je ponovno izkazalo javno oglaševanje. Velik krvodajalski potencial za prihodnost vidimo v mladih, zato bi bilo pri promociji smiselno tudi čim bolj uporabljati različna družbena omrežja. Hkrati ne smemo opustiti individualnega pristopa do krvodajalca z osebnim klicanjem in pošiljanjem SMS sporočil. Osebni pristop krvodajalce najbolj pritegne, saj se ob tem počutijo varno in so s tem bolj motivirani.

Zaradi pandemije COVID-19 smo bili primorani vzpostaviti sistem naročanja. Zadovoljni smo, da so krvodajalci naročanje dobro sprejeli in večini ustreza tudi sedaj.

Veseli nas dejstvo, da so krvodajalci zadovoljni z vsemi koraki naših storitev ob darovanju krvi. Mi smo zadovoljni, da imajo krvodajalci pri nas dobre, pozitivne izkušnje ob darovanju krvi, zato da se bodo hitreje in z veseljem vrnili. Vedno pa obstajajo možnosti za izboljšave. V naslednjem anketnem vprašalniku zadovoljstva krvodajalcev bi bilo smiselno narediti analizo glede na starost krvodajalcev. Tako bi dobili vpogled v razmišljanje in približevanje krvodajalstva različnim starostnim skupinam.

LITERATURA

1. Bani M, Strepparova M G. Motivation in Italian whole blood donors and the role of commitment. *Psychology, Health & Medicine* 2011; 641 – 649.
2. Ferguson E, Farrell K, Lawrence C. Blood Donation is an Act of Benevolence Rather Than Altruism. *Health Psychology* 2008; 327 – 336.
3. Sojka B, Sojka P. The blood donation experience: self-reported motives and obstacles for donating blood. *Vox Sanguinis* 2008; 94, 56-63.
4. Yu W, Peicong Z, Shang J, Chaofan L, Shunping L. Blood Donors Preferences Toward Incentives for Donation in China. *JAMA Network Open*. 2023;6(6):e2318320.
5. Življenje teče dalje, dostopno 1.4.2024 na povezavi: http://www.ztm.si/uploads/publication/1_ZivljenjeTece_F_WEB_SinglePage.pdf

Izkušnje po spremembi meril za izbor krvodajalcev Ocena tveganega spolnega vedenja za prenos bolezni s krvjo

Franka Erker¹, Valentina Filipović Samec¹, Polonca Mali¹

¹ Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM)

franka.erker@ztm.si

UVOD

Od 1.7.2022 so v Sloveniji v veljavi nova merila za izbor krvodajalcev, po katerih ocena tveganega spolnega vedenja za okužbo in prenos bolezni s krvjo temelji na individualni obravnavi spolnega vedenja krvodajalca oz. krvodajalke, ne glede na spol in spolno usmerjenost. Posledično smo ukinili do takrat veljaven trajni odklon krvodajalca zaradi tveganja prenosov bolezni, ki se lahko prenašajo s krvjo in spolne usmerjenosti (moški, ki imajo spolne odnose z moškim (MSM)). Spremembo meril je zahteval tudi Zagovornik načela enakosti in društvo Legebitra, po zgledu številnih držav, ki so oceno tveganja že individualizirale. Nova merila sta tako potrdila Razširjeni strokovni kolegij (RSK) za infektologijo in RSK za transfuzijsko medicino v Sloveniji. Spremembe temeljijo na že sprejetih in uveljavljenih praksah v svetu in ponavljajočim ocenam tveganj za zagotavljanje varne krvi po uvedbi sprememb pri izboru krvodajalcev.

Osnovna naloga transfuzijske službe je zagotavljanje zadostnih količin varne in kakovostne krvi in krvnih komponent za bolnike. Verjetnost, da bi z darovano krvjo prišlo do prenosa bolezni, ki se lahko prenašajo s transfuzijo, zmanjšujemo na nizko raven s kombinacijo ukrepov:

1. Izborom varnih in odgovornih krvodajalcev.
2. Presejalnim testiranjem darovane krvi na prisotnost označevalcev okužb, ki se lahko prenašajo s krvjo.
3. Tehnologijami patogene redukcije (patogenska inaktivacija) krvnih komponent.

S pomočjo medicinskega vprašalnika omogočimo darovanje varnih krvodajalcev, saj želimo preprečiti prenos okužb s krvjo. Krvodajalce, katerih vedenje ali dejavnost so povezani z večjim tveganjem okužb, začasno zavrremo, običajno za obdobje, ki je daljše od inkubacijske dobe okužbe ali za obdobje diagnostičnega okna, to je ko okužbe še ne moremo zaznati z rutinskimi presejalnimi testi. Trajno zavrremo osebe s stalnim tveganim življenjskim slogom. Pomembno je, da zavrremo vse krvodajalce, katerih vedenje je kakor koli povezano z visokim tveganjem za okužbe s HIV ter virusoma hepatitisa B in C. Zato krvodajalcem ob vsakem dajanju krvi zastavimo tudi občutljiva, osebna vprašanja o tveganjih za možnost pridobitve omenjenih okužb.

Nova merila

Z uvedbo novih meril smo za ocenjevanje primernosti krvodajalca posodobili in nadomestili predhodna vprašanja o spolni usmerjenosti v medicinskem vprašalniku za krvodajalce. Izločili smo vprašanje "Ali ste kdajkoli imeli spolne stike z moškim, ki je imel spolne odnose z drugim moškim?", ki je bilo vezano na spolno usmerjenost. Na novo so v vprašalniku postavljena vprašanja glede analnih spolnih odnosov, pri katerih je možnost prenosa okužbe večja, saj hitreje pride do mikropoškodb sluznice rektuma in s tem do stika spolnih izločkov s krvjo. Glede na podatke NIJZ je v Sloveniji večina okužb s HIV odkrita v populaciji MSM, približno petina okužb HIV pa je heteroseksualno pridobljenih. Omenjena vprašanja glede prakticiranja analnih spolnih odnosov, ki predstavljajo tvegano spolno vedenje, zajamejo tako MSM kot tudi heteroseksualno populacijo.

Vzajemno monogamni MSM ali MSM, ki v zadnjih 4-ih mesecih niso imeli spolnih odnosov, na podlagi novih meril lahko darujejo kri, če ustrezajo tudi ostalim merilom za varno darovanje krvi. Krvodajalec pa **ne sme darovati krvi, če je v zadnjih 4-ih mesecih imel:**

- več kot enega spolnega partnerja in imel analni spolni odnos,
- analne spolne odnose z novim partnerjem,

- spolne odnose z osebo okuženo s HIV, virusom hepatitisa B ali C ali s sifilisom,
- spolne odnose v zameno za plačilo,
- spolne odnose z osebo, ki si vbrizgava drogo
- spolne odnose z novim partnerjem, ki živi na območju z velikim tveganjem za prenos okužbe, ki se prenaša s krvjo.

V vseh naštetih primerih velja začasni odklon od darovanja krvi 4 mesece od zadnjega tveganega spolnega vedenja.

Poleg tega krvodajalec **ne sme darovati krvi, če je v zadnjih 12-ih mesecih** ob spolnih odnosih uporabljal rekreativne droge - t.i. chemsex (metamfetamin, mefedron, GHB, amilnitrati, kokain) ali profilaktično uporabljal zdravila za preprečevanje okužbe s HIV pred in po izpostavitvi (PrEP-preekspozicijska profilaksa in PEP-postekspozicijska profilaksa). V naštetih primerih velja 12-mesečni odklon od zadnje uporabe rekreativnih drog ali zadnje uporabe PrEP/PEP.

NAMEN

Zaradi spremembe opisanih meril, ki pomembno vplivajo na varnost krvnih komponent in na preskrbo s krvjo, je nujno ugotavljanje in ponovna ocena tveganja zagotavljanja varne krvi po 12-ih mesecih uvedbe novih oz. spremenjenih meril pri oceni individualnega tveganja za prenos okužbe zaradi spolnega vedenja krvodajalca.

METODE

Od 1.7.2022 smo v naslednjih 12-ih mesecih na posebnem obrazcu dnevno beležili število individualnih obravnav krvodajalcev zaradi tveganega spolnega vedenja. Rezultate smo nato pregledali in pripravili letno poročilo.

REZULTATI

V obdobju od 1.7.2022 do 30.6.2023 smo imeli v Sloveniji **75 obravnav krvodajalcev zaradi tveganega spolnega vedenja**. Kot **MSM se je opredelilo 16 krvodajalcev (oz. 20% vseh, ki so bili obravnavani zaradi tveganega spolnega vedenja)** – med njimi jih je nekaj več kot polovica (9) ustrezalo novim merilom in so tako uspešno darovali kri. Druga polovica (7) "MSM krvodajalcev" pa je bilo odklonjenih: štirje zaradi tveganega spolnega vedenja (nov spolni partner v zadnjih 4 mesecih, s katerim ima analne spolne odnose, več spolnih partnerjev, terapija s PrEP), trije pa niso ustrezali ostalim splošnim kriterijem za darovanje krvi (viroza, potovanje, tetovaža).

Kar **80 % primerov** (59 obravnav) zaradi tveganega spolnega vedenja so predstavljale obravnave krvodajalk in krvodajalcev, ki se niso opredelili kot MSM, vendar pa so v vprašalniku **navedli spolno vedenje, z visokim tveganjem za prenos bolezni s krvjo**. Tako je med njimi približno polovica (31 obravnavanih) bila odklonjena, in sicer največkrat zaradi analnih spolnih odnosov z novimi ali z več partnerji oz. partnericami, štirje odkloni so bili zaradi chemsex-a, dva odklona pa zaradi spolnih odnosov v zameno za plačilo.

Po uvedbi novih meril smo torej v enem letu na novo pridobili 16 krvodajalcev - to so krvodajalci, ki so se opredelili kot MSM in pred uvedbo novih meril niso smeli darovati krvi. Med njimi je dobra polovica uspešno darovala kri, druga polovica pa je bila začasno odklonjena zaradi tveganega spolnega vedenja ali zaradi drugih razlogov. Med ostalimi krvodajalci je bilo zaradi novih meril odklonjenih 31 krvodajalk in krvodajalcev.

ZAKLJUČEK

Letno se na odvzem krvi v Sloveniji prijavi približno 100.000 krvodajalcev, med njimi pa smo zaradi tveganega spolnega vedenja obravnavali le 75 oseb, kar pomeni, da je vpliv novih meril na preskrbo s krvjo zanemarljiv. Glede na letno poročilo je delež na novo pridobljenih krvodajalcev sicer manjši, kot delež krvodajalcev, ki so odklonjeni zaradi novih meril. Z uvedbo novih meril smo odpravili diskriminacijo pri izboru krvodajalcev na podlagi njihove spolne usmerjenosti. V posodobljenem medicinskem vprašalniku so na novo postavljena vprašanja glede analnih spolnih odnosov, ki predstavljajo tvegano spolno vedenje in zajamejo tako MSM kot heteroseksualno populacijo, kar predstavlja dodaten ukrep pri zagotavljanju varne krvi. Diagnostika možnih okužb pa je v zadnjih desetletjih napredovala, tako da lahko tudi z začasnimi odkloni zagotovimo varno preskrbo s krvjo.

LITERATURA

1. Pierik R, Verwij M, Laar T, Zaaijer H. Facing difficult but unavoidable choices: Donor blood safety and deferral of men who have sex with men. *Bioethics*. 2022; 36(8):840-8
2. EDQM, Council of Europe. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 20th ed.
3. Joint UKBTS Professional Advisory Committee. Change Notification UK National Blood Services No. 39-2022
4. Lucky TT, Seed CR, Waller D, Lee JF, McDonald A, Wand H, et al. Understanding noncompliance with selective donor deferral criteria for high-risk behaviors in Australian blood donors. *Transfusion*. 2014 Jul;54(7):1739-49.
5. Custer B, Stramer SL, Glynn S, Williams AE, Anderson SA. Transfusion-transmissible infection monitoring system: a tool to monitor changes in blood safety. *Transfusion*. 2016 Jun;56(6 Pt 2):1499-502.

Klinične in laboratorijske značilnosti slovenskih krvodajalcev

Ivica Marič¹, Marija Holcar², Urška Čegovnik Primožič³, Darko Černe³, Metka Lenassi²

1: Zavod Republike Slovenije za presaditev organov in tkiv Slovenija transplant, 2: Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, 3: Klinični inštitut za kemijo in biokemijo, UKC Ljubljana

ivica.maric@slovenija-transplant.si

Uvod: preskrba s krvjo omogoča nemoteno delovanje zdravstvenega sistema, saj dnevno številni pacienti potrebujejo kri za izboljšanje zdravstvenega stanja. Podaljšanje pričakovane življenjske dobe, staranje prebivalstva in moderen (nezdrav) način življenja lahko značilno vplivajo tako na preskrbo s krvjo kot tudi na porabo le-te. Prvič v človeški zgodovini se srečujemo s težavo, da je delež prekomerno prehranjenih ljudi višji od deleža ljudi, ki jim grozi lakota. Glede na zadnje poročilo WHO, je več kot 1.000.000.000 svetoven populacije debelih (ITM>30) ter več kot 1.280.000.000 ima hipertenzijo, od tega več kot 50% ni diagnosticiranih in le 20% ima ustrezno zdravljen ter uravnan krvi pritisk. V primerjavi z letom 1990 se je odstotek odraslih z debelostjo podvojil, odstotek otrok pa celo potrojil. Več kot 80% svetoven populacije ni ustrezno fizično aktivnih. Vodilni globalni vzroki smrtnosti so kardiovaskularna obolenja (32% vseh smrti v 2019), ki pa se lahko (večinoma) preprečijo z ustrezno spremembo življenjskega sloga.

Namen: s študijo smo preverili klinične in laboratorijske značilnosti (zdravih) slovenskih krvodajalcev

Metode in material: v študijo smo vključili samo zdrave krvodajalce, ki nimajo kroničnih ali akutnih obolenj ter ne jemljejo redne terapije oz. niso vzeli nobenega zdravila zadnji mesec pred darovanjem. Iz medicinskega vprašalnika smo pridobili podatek o spolu in starosti. V sklopu medicinskega pregleda smo krvodajalcem izmerili krvni pritisk, pulz in telesno temperaturo. Vsakega krvodajalca smo vprašali glede telesne teže in višine, ki sta omogočila izračun indeksa telesne mase, telesno površino in volumen krvi. Dodatno smo jih vprašali ali so zaužili obrok pred

darovanjem, ali kadijo ter samoocena režima telovadbe s tremi parametri, in sicer pogostost, intenzivnost in čas od zadnje intenzivne vadbe. Krvodajalke smo še povprašali glede uporabe hormonske kontracepcijske terapije in glede na ginekološke smernice ocenili menopavzalni status (pred-, peri- in postmenopavzalen). Nato smo vsem krvodajalcem izmerili polni hemogram ter koncentracijo apolipoproteina A1, ki je del lipoproteina HDL, in apolipoproteina B, ki je del lipoproteina LDL, ter izračunali index Apo B/Apo A1, ki je potencialni indikator kardiovaskularnih zapletov. Na manjši kohorti smo z metodo elisa določili koncentracijo C reaktivnega proteina, inzulina ter trombocitnega faktorja 4 kot stopnjo aktivacije trombocitov. Statistično smo preverili vpliv starosti, starostne skupine, spola in ostalih parametrov na izmerjene vrednosti.

Rezultati: med 506 krvodajalcih, je bilo 267 moških (53%) in 239 žensk (47%). Povprečna starost vključenih je bila 41 let. ITM v normalnem območju je imelo 225 krvodajalcev (45%), 209 (41%) v območju prekomerne teže, 52 (10%) v območju debelosti 1. stopnje, 14 (3%) v območju debelosti 2. stopnje ter 5 (1%) v območju debelosti 3. stopnje. Normalen krvni pritisk je imelo 97 (19%) krvodajalcev, blago povišan 90 (18%), v območju predstopnje hipertenzije 123 (24%) ter v območju hipertenzije 196 (39%). Nekadilcev je bilo 394 (78%), nekdanjih kadilcev 27 (5%) in kadilcev 85 (17%). Povprečne vrednosti posameznih krvnih celic so bile v normalni vrednosti, v beli krvni sliki je izstopalo 17 krvodajalcev, bodisi zaradi celokupnih levkocitov, nevtrofilcev ali limfocitov. Hb izven območja za darovanje je imelo 35 (7%), od tega 8 moških (najnižja vrednost 123 g/l) in 27 žensk (najnižja vrednost 112 g/l). Glede na Hb, MCV in MCH je 12 krvodajalk imelo zmerno mikrocitno anemijo. Povišano koncentracijo lipoproteina a je imelo 98 (19%) krvodajalcev. Apo A1 nad priporočeno mejo je imelo 10 krvodajalk in 2 krvodajalca, Apo B je imelo nad priporočeno mejo 12 krvodajalk in 10 krvodajalcev, pod mejo pa 9 krvodajalk. Indeks Apo B / Apo A1 je imelo izven priporočenega območja 16 krvodajalcev in 9 krvodajalk. Vrednost hs-CRP je imelo v območju z nizkim tveganjem za kardiovaskularne zaplete 125 (60%), z zmernim tveganjem 69 (29%) ter z visokim 14 (7%) krvodajalcev. Velika večina krvodajalcev (412 oz. 81%) je ocenilo svojo telesno aktivnost kot zmerno, preostali (94 oz. 19%) pa kot intenzivno. Pogosto aktivnih je bilo 135 (27%) krvodajalcev, preostali (371 oz. 73%) pa so bili le občasno aktivni. Starost in spol sta statistično značilno ($p < 0,05$) vplivala na ITM, RR, pulz in vrednost lipoproteinov, spol pa še na

krvno sliko. Kajenje je vplivalo na belo krvno sliko, velikost eritrocitov ter pulz. hs-CRP je statistično značilno koreliral z belo krvno sliko, vrednostjo inzulina, Apo B, indeksom Apo B / Apo A1, ITM in RR. Apo B in indeks Apo B / Apo A1 je statistično značilno koreliral s ITM in RR. Krvnoskupinski sistem ABO ter antigena D in K niso vplivali na klinične ali laboratorijske vrednosti. Ocena telesne aktivnosti je vplivala na pulz ter deloma tudi na diastolni RR.

Diskusija: kar nekaj (popolnoma zdravih) krvodajalcev je imelo klinične in laboratorijske vrednosti izven priporočenega («zdravega») območja. Kar 50% krvodajalcev je imelo ITM izven priporočljivega območja, krvni pritisk pa 60%. Oba klinična dejavnika predstavljata višje tveganje za CV zaplete. Povišan krvni pritisk bi lahko pojasnili s sindromom bele halje, ko višje vrednosti RR izmerimo v kliničnem okolju. Kljub temu nekatere študije nakazujejo, da imajo osebe s sindromom bele halje 2,5x višjo verjetnost, da razvijejo dejansko hipertenzijo v primerjavi z normotenzivnimi. Glede na podatek WHO, da ni diagnosticiranih kar 50% oseb s hipertenzijo, je verjetno kar nekaj hipertonicov v naši (zdravi) populaciji. Osebe s koncentracijo CRP nad 1 mg/l, vendar pod mejo za okužbo, imajo višje verjetnost za kardiovaskularne zaplete, saj naj bi nakazovala na potek sterilnega vnetja, ki je posledica dejavnikov tveganja (npr.: povišan ITM, povišan RR, povišan LDL, itd.). Kljub temu, da so vsi krvodajalci imeli hemoglobin merjen iz prsta v območju za darovanje, je kar 35 krvodajalcev imelo pri merjenju hemoglobina v sklopu polnega hemograma vrednosti pod dovoljenim za darovanje ter, glede na hematološke smernice, je 12 krvodajalcev imelo vrednosti Hb, MCH in MCV v območju mikrocitne anemije, 10 krvodajalcev pa vrednosti eritrocitov, Hb in Ht v območju za eritrocitozo. Seveda za potrditev stanja oz. diagnoze bi bilo treba izvesti razširjene laboratorijske preiskave ter redno spremljanje.

Zaključek: kljub temu, da smo imeli popolnoma zdrave krvodajalce, jih je kar nekaj imelo vrednosti izven priporočenega območja. Ker gre za enkratno meritev, ni nujno, da odraža kronično stanje, kljub temu so nekatere vrednosti zaskrbljujoče in jih je smiselno spremljati. Kar nekaj dejavnikov za kardiovaskularne zaplete je bilo pozitivnih oz. prisotnih (povišan ITM, povišan krvni pritisk, porušeno razmerje Apo B / Apo A1, višje vrednosti hs-CRP, nizka fizična aktivnost, kajenje). Zaskrbljujoči oz. dodatno pozornost si zaslužijo predvsem tisti krvodajalci, ki so imeli hkrati več dejavnikov tveganja. Študijo smo izvedli v Ljubljani, kar pomeni, da ni reprezentativna za celotno

Slovenijo, saj so znane razlike v življenjskem slogu med različnimi regijami oz. v primerjavi urbano/ruralno območje.

Literatura:

1. WHO; dostopno na www.who.int
2. White coat syndrome and its variations: differences and clinical impact. Pioli et. al. DOI: 10.2147/IBPC.S152761
3. The Use of High Sensitivity C-Reactive Protein in Cardiovascular Disease Detection. Castro et al. DOI: 10.18433/jpps29872
4. Apo B/apo A-I ratio and cardiovascular risk prediction. Lima et. al. DOI: 10.1590/s0066-782x2007000600014
5. Kako brati krvno sliko: Priročnik. Zver et. al. Ljubljana: Pliva, 2018.

Postopki pri pripravi component krvi za zagotavljanje varne transfuzije (ZTMS)

Izkušnje s patogeno inaktivacijo na ZTM

Urška Dolinar

Zavod RS za transfuzijsko medicino

Urška.dolinar@ztm.si

Povzetek

Patogenska inaktivacija je kot postopek v transfuzijski medicini, ki doprinaša k izboljšani varnosti krvnih component s preprečevanjem prenosa okužbe. V Sloveniji uporabljamo patogeno inaktivacijo z INTERCEPTom, ki učinkovito inaktivira viruse, bakteriji, parazite in levkocite, s čimer pripomore k večji varnosti in zaupanjem v varno transfuzijo.

Uvod

Cilj vsake zdravstvene obravnave in zdravljenja je v prvi vrsti ne škoduj. Z razvojem transfuzije medicine in preventivni ukrepi ob darovanju krvi, s testiranjem krvi ter z dodatnimi postopki povečujemo stopnjo varnosti transfundirane krvi.

Patogenska inaktivacija

Eden izmed dodatnih postopkov preventivnega ukrepanja je patogeno inaktivacija, ki odstrani ali inaktivira bakterije, druge patogene (virusi, paraziti) in levkocite z uporabo fizikalnih in/ali kemičnih metod. Posledično se zniža možnost prenosa s transfuzijo povezanih okužb in s transfuzijo povezane bolezni presadka proti gostitelju (angl. Transfusion associated graft-versus-host-disease (TA-GVHD)). Žal ne zmanjšajo tveganja za prenos prionov. Na ta način obdelane komponente se imenujejo patogeno reducirane. (1)

Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (ZTM) uporabljamo tehnologijo INTERCEPT, ki izkorišča afiniteto amotosalena za vezavo na nukleinske kisline v kombinaciji z osvetljevanjem z UV-A žarki, pod vplivom katerih se amotosalen kovalentno veže s pirimidinskimi bazami nukleinskih kislin. Nastala vez nepovratno prepreči podvajanje nukleinskih kislin. Amotosalen je sintetični derivat psoralena, ki je naravno prisoten v citrusih, figah, peteršilju in pastinjaku.

Metoda omogoča uspešno inaktivacijo širokega spektra patogenov vključujoč novonastajajoče: Gram negativne bakterije, Gram pozitivne bakterije, viruse z in brez ovojnice, praživali, spirochete. Ne inaktivira nekaterih virusov brez ovojnice (HAV, HEV, parvovirus B19, poliovirus) ter spore *Bacillus cereus* (2). Postopek ne vpliva na funkcionalnost in hemostatske funkcije trombocitov (3). Patogenska inaktivacija podaljša rok uporabe enot trombocitov iz 5 na 7 dni (2). Posledično se poveča število enot trombocitov v zalogi, lažje se zagotavlja krvnoskupinsko skladne enote ter uravnava zalogo z zmanjšanjem števila zapadlih enot (4). Cenovni vložek v novo tehnologijo iluzorno prispeva k višji ceni komponente. Vzporedno s stroškom je potrebno upoštevati tudi druge dejavnike (5), ki vplivajo na ceno. Npr. Zaupanje bolnika v varno transfuzijo je neprecenljivo (6).

Za vpeljavo procesa je potreben dolgotrajen administrativen proces odobritve komponente regulatornih organov – Javna agencija za medicinske pripomočke (JAZMP).

Na ZTM se je med letoma 2007 in 2009 v Centru za predelavo vpeljevalo veliko novosti. Do takrat so se trombociti izdajali kot trombocitna plazma (ang. Platelet rich plasma-PLP) posameznega krvodajalca. Produkt se je naročal kot »trombociti iz treh litrov krvi«. Na oddelek so za transfuzijo prejeli 6 vrečk PLP. Naročniki so lahko naročili filtrirane trombocite iz treh litrov krvi. Ob takem naročilu so zaposleni zlili trombocitno plazmo šestih krvodajalcev ter ga filtrirali. Ker je bil to odprt sistem, je bil rok uporabe enote zelo kratek. Sočasno se je pojavila zahteva, da morajo biti izdane enote bakteriološka nadzorovane. Hkrati so imeli hemofiliki upravičen strah pred prenosom bolezni z zdravili iz krvi. Za nadomeščanje faktorja strjevanja krvi so želeli zdravilo pripravljeno iz slovenske plazme. Ker so se v procesu predelave začele vpeljevati ohranitvene raztopine, ki so nadomestile del plazme, se je lahko večji del plazme namenil za frakcionažo. Razvijale so se tudi

vrečke za odvzem, različne centrifuge, aparati za ločevanje krvi. Novi vpeljani postopki so prinesli številne prednosti. Z uporabo top-and-bottom vrečk za odvzem polne krvi, so se enote lahko ločevale na plazmo, eritrocite ter trombocitno-levkocitno plast. Slednje lahko združujemo z ohranitveno raztopino v zaprtem sistemu. Pred pripravo končne enote trombocitnega zlitja je bila vsaka enota tudi filtrirana. Taka enota trombocitov v ohranitveni raztopini, z majhnim deležem plazme, je bila primerna tudi za vpeljavo postopka patogene inaktivacije, ki je omogočila podaljšanje roka uporabe brez dodatnih ukrepov na 7 dni. Pred tem je bil rok uporabe trombocitne plazme 5 dni, vendar so se v praksi izdajali le trombociti mlajši od štirih dni. Četrty dan so bili uporabni le, če je zanje s podpisom jamčil zdravnik.

Z vpeljavo novih postopkov se je dvignila raven kakovosti pripravkov, saj so bili vsi filtrirani. Vsaka enota trombocitov je vsebovala manjši delež plazme, s čimer se je zmanjšala možnost neželenih reakcij. Preostanek plazme je bil tako namenjen za pridobivanje zdravil iz krvi iz slovenske plazme, za katere je bilo v obdobju pred rekombinantnimi faktorji strjevanja krvi med hemofiliki veliko povpraševanje. Z vpeljavo postopka patogene inaktivacije smo se lahko izognili vpeljavi rutinske bakteriološke kontrole za vsako enoto, kot tudi potrebi po obsevanju enot trombocitov ali iskanju citomegalovirus (CMV) negativnih enot trombocitov.

Pri rutinski bakteriološki kontroli je namreč potrebno vsako enoto nacepiti in gojiti na gojišču 36 ur po odvzemu. Po inokulaciji jih je potrebno inkubirati 6 ur. Torej se enote trombocitov uporabi za izdajo šele 42 ur po odvzemu, če so kulture ob tem negativne. Gojiti jih je potrebno še 6 dni (7).

Leta 2022 smo preko internega projekta izvedli validacijo patogensko inaktivirane plazme po merilih takrat izdanih smernic – 20. izdaja. Glede na korake določene v dokumentu Vodenje sprememb, smo novo komponento leta 2023 prijavili JAZMP. Nadzor je bil vršen po merilih 21. izdaje smernic (1), ki zahteva tudi merjenje preostalega amotosalena v končnem produktu kot del validacije. Ker v okviru validacije meritev ni bila opravljen, moramo narediti revalidacijo, ki nas čakav letu 2024. Omenjeno testiranje izvajajo v Établissement français du sang (EFS) v Franciji na Oddelku za kontrolo kakovosti. Poleg zagotavljanja primernih vzorcev, moramo organizirati in izvesti tudi transport zamrznjenih vzorcev na suhem ledu.

Od vpeljave postopka patogenske inaktivacije trombocitov je preteklo že 16 let. Z vsakodnevnim delom se srečujemo tudi z neljubimi zapleti na cseh korakih, kjer je vpleten človeški faktor: enote med inkubacijo v CAD fazi nam padejo s police tresalnika v inkubatorju, pozabljena je osvetljena enota trombocitov v osvetljevalniku, uporaben je neustrezen set glede na prostornino... Vsak spodrsrlaj izkoristimo za osvežitveno usposabljanje, optimizacijo prostorov, opreme in procesov.

Zaključek:

Transfuzijske ustanove po vsem svetu vedno bolj sprejemajo inaktivacijo trombocitov in plazme zaradi povečanja varnosti transfuzij krvi. Na splošno so bile izkušnje s temi tehnologijami pozitivne, z znatnim zmanjšanjem tveganja za okužbe, ki se prenašajo s transfuzijo, in ohranjeno funkcionalnostjo trombocitov. V Sloveniji je znan primer prenosa bolezni s transfuzijo enote plazme, po transfuziji patogensko inaktiviranih trombocitov istega dajalca do prenosa hepatitisa B ni prišlo. Zapletov zaradi patogensko reduciranih enot ne beležimo. Z vpeljanim postopkom povečujemo neprecenljivo zaupanje bolnikov do transfuzije krvi z najvišjo stopnjo varnosti.

Literatura:

1. Doerr, P. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM); 2023.
2. Irsch J, Lin L. Pathogen Inactivation of Platelet and Plasma Blood Components for Transfusion Using the INTERCEPT Blood System™. *Transfus Med Hemother.* 2011; 38(1):19–31.
3. Cid J, Charry P, Lozano M. Therapeutic efficacy and safety of pathogen-reduced platelet components: Results of a meta-analysis of randomized controlled trials. *Vox Sang.* 2024; 119: 203-11.
4. Richard P, Pouchol E, Sandid I, Aoustin L, Lefort C, Chartois AG, et al. Implementation of amotosalen plus ultraviolet A-mediated pathogen reduction for all platelet concentrates in France: Impact on the risk of transfusion-transmitted infections. *Vox Sang.* 2024;119(3):212–8.

5. McCullough J, Goldfinger D, Gorlin J, Riley WJ, Sandhu H, Stowell C, et al. Cost implications of implementation of pathogen-inactivated platelets. *Transfusion*. 2015;55(10):2312–20.
6. McCullough J. Pathogen inactivation: A new paradigm for blood safety. *Transfusion*. 2007;47(12):2180–4.
7. <https://www.blood.ca/en/hospital-services/products/donation-testing>

Challenges in implementing pathogen inactivation technique in Transfusion centre Celje

Zoran Bolta

Transfuzijski center, Splošna bolnišnica Celje, Oblakova ulica 5, 3000 Celje

zoran.bolta@sb-celje.si

Introduction: Pathogen inactivation technique (PIT) offers considerable advantages, but also some drawbacks. Meticulous care to puncture site cleaning assured us of safe products and no bacterial sepsis due to bacterial transmission through blood component were recorded. Advantages of PIT were considered, analyzed and additionally in light of viral disease transmission, proposed to medical director although not realized at that moment. More than decade ago the PIT was implemented in Slovenia at BTCS in the form of pathogen inactivated platelets as first inactivated component with sufficient clinical results. Slovenian scientific committee decided in 2021 to recommend the PIP only to be available for transfusion, starting with 2023. That obligation was again presented and this time confirmed by the hospital medical director mid 2021.

Aim: Our aim was to implement the pathogen inactivated platelets (PIP) in General hospital Celje until the end of 2022. Equipment and performance specifications were prepared and presented to purchasing department. Unfortunately, the sequel of Covid crisis and general management changes, leading to financial plan changes, which elongated the tender release until the end of 2022. Due to nonconforming technical specifications and noncompliance about the length of the service provided, the tender was not successful. That fact forced us to find suitable outside provider of PIT for platelets as mandatory.

Material and methods: Since implementation of buffy coat (BC) method of pooled platelets preparation was executed 15 years ago, traditionally we were preparing pools of 4 BC, conforming to EU recommendations required level. In preparation for implementation of PIT we validated the 5 BC pooled platelets to elevate the platelet content as required by the expected procedure losses and implement it in to the routine. After we realized that the tender was not to be successful, we launched another tender for PIP procedure contractor.

Results: Tender received an offer from ZTM. After presenting specifications and composition of our pooled platelets, they were able to calculate the correct procedure parameters. Pooling of platelets is performed in the morning after previous collection day and are transported to ZTM through regular transport service held in our hospital. Evening collection of inactivated product is additional requirement performed.

Conclusions: In first year of regular use of PIP we can conclude positive effects with no pathogen transmission recorded and substantially improved expiry statistics due to elongated shelf life of the component. Service from contractor was performed on exemplary level with expected minor mishaps during procedure. From clinical side we have not received any reports of unwanted side effects with satisfactory post transfusion efficiency of the new product. As the cooperation with PIT provider continues, the cost effectiveness and logistical considerations oblige us to implement PIT with all its new evolutions and improvements in Transfusion centre Celje.

Izkušnje pri uvajanju patogene inaktivacije v CTM Maribor

Nataša Harkai, Petra Leber

Center za transfuzijsko medicino, Univerzitetni klinični center Maribor, Slovenija

natasa.harkai@ukc-mb.si

Uvod

Pri pripravi krvnih pripravkov se izvajajo številni ukrepi, s katerimi se zagotavlja kakovost in varnost le teh, vendar so navkljub strogim merilom za krvodajalce, čiščenjem vbodnega mesta in številnim testiranjem, lahko patogeni še vedno prisotni. Lahko gre za nam zaenkrat neznane patogene, kontaminacijo, patogene, nezaznavne s testiranjem, nedostopnost testiranj. Trombociti so pogosteje lahko vzrok za prenos bakterijskih okužb zaradi njihovega shranjevanja pri sobni temperaturi. Z inaktivacijo patogenov se zmanjša število mikrobov sposobnih replikacije v pripravkih koncentriranih trombocitov in sveže zamrznjene plazme ter obenem pride do inaktivacije levkocitov in inhibicije tvorbe citokinov.

Namen

Predstaviti izzive pri postopku uvedbe in opredeliti pozitivne ter negativne izide oziroma izkušnje po uvedbi patogene inaktivacije trombocitov v Centru za transfuzijsko medicino UKC Maribor.

Material in metode

V Centru za transfuzijsko medicino UKC Maribor smo decembra 2022 uvedli metodo inaktivacije patogenov v trombocitnih pripravkih Intercept (Cerus), z amotosalenom in UVA žarki za trombocite pridobljene iz polne krvi, z zlitjem 5 BC v ohranitveni raztopini Intersol (TBP). Analizirali smo podatke o porabi in zapadlosti trombocitnih pripravkov v našem centru

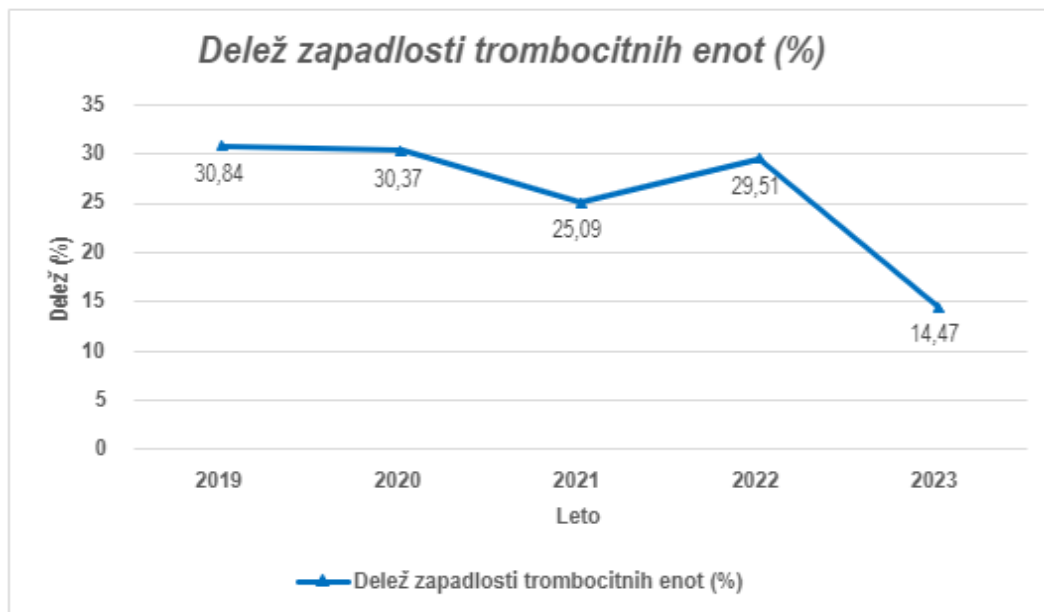
pred in po uvedbi postopka (od januarja leta 2019 do decembra 2023), ki smo jih pridobili iz sistema Datec.

Rezultati

V mesecu juniju leta 2022 je bilo s strani podjetja Cerus predstavljen sistem Intercept in izvedeno izobraževanje izvajalcev ter opravljena validacija postopka v obdobju med julijem in septembrom 2022. Sam postopek smo v redno delo uvedli v mesecu decembru. Za potrebe validacije se je za kontrolo vzorčilo 15 enot. Inaktivacijo trombocitov je potrebno izvesti v prvem dnevu (D1), do 24h po odvzemu krvi, zato so se zlitih trombociti (TFB) vzorčili na dan 1 (D1), pred inaktivacijo in nato TBP od drugega dneva (D2), do dneva zapadlosti (D8). Prvi dan smo testirali TFB pred inaktivacijo: volumen pripravka, število trombocitov v enoti, število eritrocitov v enoti in število levkocitov. Od D2 se je pri TBP testiral volumen, število trombocitov, prisotnost meglic in pH, na dan zapadlosti se je odvzel vzorec za testiranje sterilnosti. Vse enote so bile ustrezne in rezultati znotraj predpisanih normativov.

Tabela 1: Podatki o predelavi in izdaji trombocitnih enot v CTM UKC Maribor v obdobju med 2019 in 2023

Leto	Število izdanih enot	Število zapadlih enot	Število pripravljenih enot
2019	1540	694	2250
2020	1485	657	2163
2021	1658	553	2204
2022	1614	690	2338
2023	1787	302	2087



Graf 1: Delež zapadlosti trombocitnih enot v obdobju od 2019 do 2023

Iz naših podatkov je razvidno, da je v letih od 2019 do 2022, ko so se pripravljali in uporabljali predvsem zlit trombociti (TFB), bil povprečni delež zapadlosti enot 29,0%. Delež vseh zapadlih enot koncentriranih trombocitov po uvedbi inaktivacije je bil v letu 2023 14,5%. Delež zapadlosti samo TBP enot v letu 2023 je znašal še nekoliko manj in to je 13,7%. Število pripravljenih trombocitnih enot je v letu 2019 znašalo 2250 in v primerljivem številu ostala leta, lansko leto je bilo pripravljenih manj enot, in sicer 2087. Število izdanih enot se je v zadnjem letu povečalo in je v primerjavi s povprečjem prejšnjih let bilo izdanih 212 enot trombocitov več.

Glede na potrebe se iz Zavoda za transfuzijsko medicino (ZTM) pripeljejo obsevane in inaktivirane enote trombocitov, število teh enot se na letnem nivoju zelo razlikuje. Leta 2018 je bilo pripeljanih 88 enot, naslednji dve leti pa 30 oziroma 33 enot. Lansko leto je bilo pripeljanih 11 enot trombocitov.

Zaključek

Začetek postopka implementacije inaktivacije patogenov v naši ustanovi se je zaradi ovir, ki jih je predstavljala epidemija SARS-CoV-2 zavlekel in posledično je prišlo do implementacije šele lansko leto.

Iz zgoraj navedenih rezultatov lahko vidimo prepolovljen delež zapadlosti trombocitnih enot v letu 2023 v primerjavi z ostalimi leti, za kar je najverjetneje zaslužen daljši rok uporabe TBP, ki je sedem dni, medtem ko je pri TFB pet dni, posledično je odločitev o številu potrebnih enot bolj optimizirana, kar je razvidno tudi iz zmanjšanega števila pripravljenih enot v primerjavi s prejšnjimi obdobji.

V letu 2023 je bilo izdanih več enot trombocitov kot prejšnja leta. To je lahko popolnoma naključno, saj se poraba iz leta v leto nekoliko spreminja. Sam postopek inaktivacije po literaturi nekoliko zmanjša število trombocitov v pripravku, tudi njihova funkcija naj bi bila 6-7 dan že nekoliko oslABLJENA, kar pa naj ne bi bistveno vplivalo na preživetje in funkcionalnost trombocitov in vivo. Če je večja izdaja povezana s samim postopkom inaktivacije, saj pride do manjšega padca števila trombocitov v primerjavi s TFB, ali pa so vzroki za to drugačni, je v tem trenutno nemogoče sklepati, saj imamo podatke zgolj za eno leto in bo za objektivne in realne ugotovitve potrebno analizirati podatke čez nekaj let, ko bo očiten nek trend uporabe.

Sprva se je postopek izvajal v prostorih predelave, kar pa prostorsko in časovno ni bilo optimalno, in smo v Centru za transfuzijsko medicino UKC Maribor v obdobju od validacije uredili ločen, ergonomsko primeren prostor v katerem se izvaja postopek, kjer je vzpostavljeno krožno pomikanje, da ne pride do križanja neobsevanih in obsevanih komponent.

Najpomembnejši vidik za pripravo in uporabo TBP je varnost pripravkov za paciente, saj je prisotna manjša verjetnost za prenos mikrobov. Glede na visoko raven inaktivacije levkocitov je trombocitni pripravek obdelan s psoralenom enakovreden gama obsevanemu v smislu preprečevanja s transfuzijo povezane bolezni presadka proti gostitelju. S psoralenom obdelani

trombociti so vedno na voljo bolnikom, ki potrebujejo obsevane krvne komponente. To je tudi razlog za zmanjšano število pripeljanih obsevanih enot trombocitov iz ZTM.

Literatura

1. Hardwick J, Lozano M. Blood processing and components; ISBT Science Series; 2020 [citirano 25. 3. 2024]. Dostopno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/voxs.12598>.
2. Milojković A, Cukjati M, Domanović D. Inaktivacija patogenov v humani plazmi z riboflavinom in UV žarki: vpliv postopka na koagulacijski faktor VIII. Zdrav Vestn. 2012; 81 supl 2: II-291–8.
3. Blais-Normandin I, Tordon B, Anani W, Ning S. Pathogen-reduced platelets. Clinical Guide to Transfusion. Ottawa: Canadian Blood Services, 2022 [citirano 25. 3. 2024]. Chapter 19. Dostopno na: <https://professionaleducation.blood.ca>
4. Lindholm PF, Annen K, Ramsey G. Approaches to minimize infection risk in blood banking and transfusion practice. Infect Disord Drug Targets; 2011; 11:45-56.

Postopki pri pripravi komponent krvi za zagotavljanje varne transfuzije: Novosti na področju kontrole kakovosti

Boštjan Smrekar

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM), Ljubljana

bostjan.smrekar@ztm.si

Evropski direktorat za kakovost zdravil in zdravstveno oskrbo (The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare – EDQM) je direktorat Sveta Evrope, ki izhaja iz Konvencije o pripravi Evropske farmakopeje in je vodilna organizacija s področja varovanja javnega zdravja. Glavna naloga EDQM je razvoj standardov kakovosti za varna zdravila, podpora izvajanju in spremljanje njihove rabe. Ti standardi so prepoznani kot znanstvena merila in se uporabljajo po celem svetu. EDQM oblikuje smernice in standarde na področju transfuzije krvi, presaditve organov, celic in tkiv ter vprašanj, povezanih s potrošniki.

Priporočila za pripravo, uporabo in zagotavljanje kakovosti krvnih komponent (The Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components) ali krajše Standard za kri, so obsežna zbirka široko sprejetih, usklajenih evropskih standardov, ki določajo varnost, učinkovitost in zahteve kakovosti za pripravo, uporabo in kontrolo krvnih komponent v Evropi in širše. Priporočila so namenjena vsem strokovnjakom, ki delajo na področju darovanja, zbiranja, testiranja, obdelave, shranjevanja, distribucije in transfuzije krvi in krvnih komponent, vključno s transfuzijskimi centri, bolnišničnimi krvnimi bankami ter zdravstvenimi in regulatornimi strokovnjaki na področju krvi.

V 21. izdajo Priporočil, ki so bila izdana maja 2023, so vključene dopolnjene Smernice za dobro prakso in spremembe v izboru darovalcev. Če se omejim samo na končno kontrolo kakovosti, je

pri enotah trombocitov v ohranitveni raztopini ob koncu roka uporabnosti predlagan nov občutljivejši kazalnik kakovosti. Trenutno se izvaja merjenje pH.

Merjenje pH ali glukoze?

Glukoza v enotah trombocitov se po glikolitični poti presnavlja v mlečno kislino (laktat), kar pelje v znižanje pH. Izčrpanost glukoze je običajno posledica sprememb v presnovi trombocitov, ki se kaže v povečani stopnji glikolize, temu pa sledi znižanje pH. Ti rezultati kažejo, da je poleg znižanja pH izčrpanost glukoze prav tako škodljiva za trombocite med shranjevanjem. Pričakovano zmanjšanje pH vrednosti med shranjevanjem je opazno po šestem dnevu pri trombocitih, ki so suspendirani v plazmi. Ta pojav je pripisan porabi bikarbonata, ki je glavni pufer v plazmi. V devetdesetih letih prejšnjega stoletja so razvili ohranitvene raztopine za trombocite (platelet additive solution - PAS), ki so se po letu 2000 začele množično uporabljati. S temi raztopinami se nadomesti del plazme, ki se jo lahko porabi za frakcioniranje, posledično pa tudi zmanjša možnost nastanka nekaterih neželenih transfuzijskih reakcij pri pacientih po prejetju tovrstnih enot trombocitov. Izvedene so bile številne študije za oceno in vitro kakovosti trombocitov, shranjenih v PAS raztopinah z različnim deležem plazme. Za uspešno nadomeščanje plazme v enotah trombocitov sta v PAS dodana fosfat in acetat, ki stabilizirata pH vrednosti.

Z uporabo PAS se podaljša rok uporabnosti trombocitov do 7 dni. Količina plazme dodane v PAS se giblje med 30 % in 40 %. Vrednosti pH > 6,4 trombocitov v mešanici plazme/PAS ostanejo stabilne do 7 dni, nekatere publikacije omenjajo celo do 14 dni. Zato se je Saunders v svoji publikaciji leta 2011 spraševal o smiselnosti merjenja pH kot kazalnika kakovosti za trombocite shranjena v mešanici plazme/PAS.

Merjenje pH(22°C) na koncu priporočenega roka uporabnosti z vrednostjo nad 6,4 je ustrezno le za trombocite, shranjene v plazmi. Pri trenutno uporabljenih PAS-E raztopinah (Intersol®, SSP+, TPAS+, PASIIM) v razmerju 30 – 40 % plazme in 60 – 70 % PAS se pH ne bo znižal pod 6,8, zaradi kapacitete pufranja (delno s fosfatom, delno s presnovo acetata). Tudi ko efekt vrtnčenja (swirling) ni več opazen, pH ostane stabilen. Iz tega sledi, da merjenje pH kot kontrola procesa ni ustrezno za tovrstne trombocitne komponente. Namesto tega je merjenje odsotnosti glukoze

boljši napovednik za izgubo sposobnosti vrtnčenja trombocitov, ki se zgodi 1-2 dneva od porabe glukoze. Če je na koncu roka uporabe trombocitnih pripravkov glukoza še merljiva ($> 0,5$ mM), bo prisotno tudi vrtnčenje trombocitov, s katerim posredno preverjamo ustreznost trombocitnih komponent.

Obstajajo različne metode za kvantifikacijo glukoze z različnimi mejami zaznavnosti, zato je bil uveden izraz meja kvantifikacije (Limit of quantification) – najnižja raven, ki jo je mogoče določiti natančno in ponovljivo. Če želimo numerično vrednost, bo ta drugačna glede na uporabljeno metodo/napravo, zato je potrebno določiti mejo, ki bo pokrila vse metode. Predlagana meja kvantifikacije je $0,5$ mM.

Delovna skupina je v 21. izdaji Standarda za kri oblikovala naslednje priporočilo:

Merjenje glukoze v enotah trombocitov, shranjenih v ohranitveni raztopini (PAS), lahko predstavlja alternativo merjenju pH vrednosti. Glukoza dobro korelira s prisotnostjo vrtnčenja, zato je njena uporaba kot kazalnik kontrole kakovosti bolj zanesljiva in praktična.

Izkušnje iz ZTM Ljubljana:

V oktobru 2023 smo v Laboratoriju za končno kontrolo krvnih komponent poizkusno uvedli merjenje glukoze pri enotah trombocitov ob koncu roka uporabnosti. Vsem enotam smo izmerili pH in številčno koncentracijo trombocitov in jih vključili v končno kontrolo kakovosti. Merjenje glukoze so za nas izvajali na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB), Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Meritve so se izvajale na aparatu Alinity C (Abbot) s heksokinazno metodo, katere meja detekcije glukoze je $0,3$ mM.

Od oktobra do konca decembra smo testirali 48 enot trombocitov: 37 enot zlitij in 11 enot aferez. Vse enote so bile testirane 8. dan po pripravi, oziroma en dan po koncu uporabnosti. Vrednosti glukoze so bile pri zlitjih pod mejo določljivosti ($< 0,3$ mM) pri 11 enotah od 37, pri aferezah pa pri 11 od 11 enot. Vrednost pH je bila pri vseh enotah trombocitov po koncu roka uporabnosti $> 6,4$, kar ustreza priporočilom EDQM. Pri vseh testiranih enotah je bil opazen efekt vrtnčenja (swirling) trombocitov.

Nato smo izvedli test, pri katerem smo različnim enotam trombocitov (zlitja in afereze) merili koncentracijo glukoze vsak dan od dneva priprave do konca uporabnosti. S tem smo želeli ugotoviti, kakšen je trend porabe glukoze v odvisnosti od časa. Rezultati so pokazali, da se glukoza hitreje porablja pri trombocitih, ki so pripravljene s postopkom afereze. Po pregledu literature in študij proizvajalca afereznih aparatov, smo ugotovili, da je stopnja aktivacije trombocitov pri afereznih odvzemih večja, kot pri trombocitih, pripravljenih s postopkom zlitja. Večji odstotek aktivacije povzroči povečan metabolizem trombocitov, to pa se kaže v večji porabi glukoze.

Nato smo se posvetovali s proizvajalcem aparatov za afereze, kako bi povečali koncentracijo glukoze v enotah trombocitov. Ker ohranitvene raztopine ne vsebujejo glukoze, je edini vir glukoze sveža plazma, ki je v postopku priprave v določenem razmerju dodana k PAS. Postopek je popolnoma avtomatiziran. Priporočila proizvajalca navajajo dovoljene meje v razmerju med svežo plazmo in ohranitveno raztopino PAS, ki znašajo od 53 % do 68 % na račun PAS. Pri enem aparatu smo poskusno spremenili razmerje plazma/PAS, tako da smo odstotek plazme povečali za 10 %. S povečanjem odstotka sveže plazme v enotah trombocitov smo želeli povečati koncentracijo glukoze in s tem podaljšati njeno dostopnost. Nato smo ponovili merjenje glukoze pri enotah trombocitov v odvisnosti od časa. Preliminarni rezultati so pokazali, da smo s spremembo razmerja plazma/PAS uspeli koncentracijo glukoze toliko povečati, da je ta merljiva še ob koncu roka uporabnosti pri vseh testiranih enotah trombocitov (sedmi dan). Na osnovi dobljenih rezultatov bomo izvedli postopek validacije novih nastavitve aparatov in če bo ta uspešna, spremenili postopek zbiranja trombocitov s postopkom afereze.

Literatura:

1. European Committee on Blood Transfusion. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 21st Edition 2023. EDQM, Council of Europe
2. Gulliksson H. Platelet storage media. Vox Sang 2014; 107:205-212.

3. Saunders C, Rowe G, Wilkins K, et al. In vitro storage characteristics of platelet concentrates suspended in 70% SSP+™ additive solution versus plasma over a 14-day storage period. *Vox Sang* 2011; 101:112-121.

4. Leitner GC, List J, Horvath M, et al. Additive solutions differentially metabolic and functional parameters of platelet concentrates. *Vox Sang* 2016; 110:20-26.

Kakovost v transfuzijski medicini

Quality management in transfusion medicine- the importance of international cooperation

Tomislav Vuk

Croatian Institute of Transfusion Medicine

tomislav.vuk@hztm.hr

Continuous scientific and technological progress and lessons learned from the past have built modern transfusion medicine, which is characterized by the high quality and safety of transfusion treatment. A strong regulatory framework and quality management system that integrates hemovigilance have also contributed to this progress. International cooperation is a powerful tool in accelerating progress through knowledge sharing, education, monitoring of best practices and timely identification of emerging threats. Lessons learned during the COVID-19 pandemic were the impetus for defining coordinated international activities in prevention, preparedness and timely response to cross-border threats, including maintaining sufficient supplies of incoming materials, blood components and other resources.

The proposal of the new SOHO regulation recognized the importance of cooperation among member states, through the establishment of the SoHO Coordination Board, which will assist SoHO competent authorities in the implementation of the Regulation, as well as the EU SoHO platform, which aims to exchange information, share good practices, etc. The new SoHO regulation relies heavily on cooperation between the EC, EDQM and ECDC. The use of ECDC and EDQM requirements as technical standards will enable a more flexible approach in harmonizing with regulatory requirements.

Good Practice Guidelines (GPG), which provide standards and specifications of quality systems in blood establishments and hospital blood banks, were developed in cooperation of EC and EDQM. In 2012, EDQM started its Blood Quality Management (B-QM) program with the aim of providing support to European blood establishments in the development, implementation and improvement of quality systems. EDQM also organizes the Blood Proficiency Testing Scheme (B-PTS) for laboratories of European blood establishments that are responsible for testing individual blood donations.

International cooperation is achieved through numerous other organizations and professional associations. ISBT has 15 working parties (WP) that promote research and share good practice in all areas of transfusion medicine. One of them is WP on quality management (WP-QM), which provides guidance and education in the field of quality management. Two projects are currently active: “Quality indicators for blood establishments and hospital blood banks” and “Definitions utilized in quality management of blood establishments”.

International cooperation is particularly respectable in the field of hemovigilance, where various international organizations (IHN, WHO and ISBT in particular) make constant efforts to promote hemovigilance, not only through individual but also joint initiatives. Their activities include cooperation and networking between members, publishing guidelines, reports and templates, providing educational materials and tools, organizing training and education, providing support in the implementation of hemovigilance in developing countries. WHO is also very active in publishing numerous guidelines, reports and policies related to the availability, quality and safety of blood, and often collaborates with other international organizations in their development.

European Blood Alliance (EBA) activities are strongly focused on cooperation and knowledge exchange, with the aim of achieving a safe and high-quality blood supply in Europe. In achieving its goals, it closely cooperates with European policy-makers and partner organizations.

The above examples demonstrate the great importance of international cooperation in the field of quality management in transfusion medicine.

Kakovost v transfuzijski medicini: Kontrola kakovosti krvnih komponent na ZTM (predstavitev dejavnosti Odseka za končno kontrolo kakovosti krvnih komponent)

Boštjan Smrekar

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM), Ljubljana

bostjan.smrekar@ztm.si

Pomemben člen preskrbe s krvjo je preverjanje kakovosti krvnih komponent, ki so pripravljene v procesu predelave polne krvi, oziroma krvnih komponent, pridobljenih z afereznim zbiranjem. Z merjenjem hematoloških in biokemijskih parametrov ugotavljamo ali krvni pripravki dosegajo predpisane standarde in priporočila. Kriteriji, ki jim sledimo, so zapisani v Zakonu o preskrbi s krvjo, bolj natančno in posodobljeno pa v dokumentu Priporočila za pripravo, uporabo in zagotavljanje kakovosti krvnih komponent (Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 21.st edition, 2023). Slednjega že od leta 1986 pripravlja Direktorat Sveta Evrope EDQM (Evropski direktorat za kakovost zdravil in zdravstveno oskrbo). Tem priporočilom sledijo vse države članice Sveta Evrope in tudi številne izven. Z doseganjem kriterijev kakovosti lahko zagotavljamo varnost tako krvodajalcev kot pacientov, transfuzijski centri držav članic pa so med seboj bolj poenoteni in primerljivi.

Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino Ljubljana je bil leta 2003 ustanovljen Laboratorij za končno kontrolo kakovosti krvnih komponent (LKKKKK). Že ob ustanovitvi je bilo dogovorjeno, da bo laboratorij preverjal enote eritrocitov, trombocitov in sveže zamrznjene plazme, svoje kompetence pa bo izkazoval s sodelovanjem v Slovenski nacionalni shemi za zunanjo oceno kakovosti SNEQAS, ki jo izvaja Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo. Od takrat je laboratorij zadolžen za preverjanje kakovosti krvnih komponent, ki so na ZTM pripravljene v postopkih predelave krvi.

Vsi krvni pripravki morajo dosegati predpisane vrednosti določenih hematoloških in biokemijskih parametrov ter volumna. Na ZTM vsakodnevno pripravljamo redne in izredne enote iz krvi. Med redne uvrščamo enote eritrocitov, trombocitov in sveže zamrznjene plazme. Med izredne enote uvrščamo eritrocite v AB plazmi, oprane eritrocite v fiziološki raztopini ali ohranitveni raztopini, oprane trombocite v ohranitveni raztopini, enote avtotransfuzij in granulocite. Vse te enote pripravljamo po naročilu lečečih zdravnikov za točno določenega bolnika.

Za preverjanje kakovosti enot eritrocitov kontroliramo koncentracijo hemoglobina, vrednost hematokrita, vsebnost levkocitov, pri izrednih enotah še koncentracijo celokupnih beljakovin in stopnjo hemolize. Pri sveže zamrznjeni plazmi določamo vsebnost eritrocitov in levkocitov, število trombocitov, celokupne beljakovine, koncentracijo fibrinogena in aktivnost faktorja VIII po enem mesecu zamrzovanja. Pri pripravkih trombocitov preverjamo njihovo številčno koncentracijo, vsebnost levkocitov, vrednost pH ob koncu uporabnosti in mikrobiološko kontrolo pred postopkom patogene inaktivacije. Kriterije mora izpolnjevati 90 % vseh pretestiranih komponent za vsak parameter posebej. Mikrobiološka ustreznost je zahtevana v 100 %.

Na letnem nivoju pretestiramo najmanj 1 % vseh pripravljenih komponent. V letu 2023 smo v postopku redne kontrole kakovosti testirali 2026 krvnih pripravkov, izvedli smo 3733 preiskav in preverili 4227 analitov. Ustreznih je bilo 98,5 % vseh merjenih parametrov.

Poleg osnovne dejavnosti laboratorij izvaja še mikrobiološko kontrolo površin, zraka in prostorov ter celičnih in drugih terapevtskih pripravkov Oddelka za terapevtske storitve na ZTM. Za njih izvajamo tudi test za odkrivanje bakterijskih endotoksinov.

Metode in aparati, ki jih v LKKKKK uporabljamo so hematološki analizator za določitev hematokrita, koncentracije hemoglobina in številčne koncentracije trombocitov. Vsebnost levkocitov merimo s postopkom pretočne citometrije, pH pa merimo potenciometrično. Aktivnost faktorja strjevanja krvi VIII in koncentracijo fibrinogena se določa nefelometrično v Laboratoriju za hemostazo Specialnega hematološkega laboratorija. Glukoza se meri s heksokinazno metodo, prosti hemoglobin pa spektrofotometrično. Celokupne beljakovine se določajo z biuretsko reakcijo, izvaja pa jih laboratorij Centra za imunologijo in razvoj na ZTM. Mikrobiološko kontrolo

izvajamo s postopkom gojenja v hemokulturah pod aerobnimi in anaerobnimi pogoji. Postopek poteka tako, da v stekleničke z gojiščem pod aseptičnimi pogoji nacepimo predpisan volumen testnega vzorca in ga inkubiramo 7 dni pri 35 °C. Za to uporabljamo sistem BD BacTec®. V primeru pozitivnih rezultatov pošljemo vzorec v Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, kjer opravijo specialno diagnostiko mikroorganizma in antibiogramski test. Za določanje vsebnosti endotoksinov v vzorcih uporabljamo prenosni spektrofotometer Endosafe Nexgen-PTS, kjer testiramo pripravke mezenhimskih matičnih celic (MSC), ki jih pripravljajo na Oddelku za terapevtske storitve (Center za kriobiologijo). LAL test, znan tudi kot *ang. Limulus ameobocyte lysate test*, je in-vitro test, ki ga uporabljamo za odkrivanje bakterijskih endotoksinov.

Poleg rednega dela sodelujemo pri validacijah aparatov in postopkov na Oddelku za preskrbo s krvjo na ZTM. Pri sumu na neželjeno transfuzijsko reakcijo izvajamo teste za Službo za hemovigilanco, v primeru neskladij, ki so povezani s krvnimi komponentami pa poizkušamo najti vzrok in skladno z rezultati podamo priporočila za odpravo neskladja.

Za zagotavljanje zanesljivih in pravilnih rezultatov naših preiskav, poleg izvajanja notranjih kontrol, vsako leto redno sodelujemo v različnih shemah za zunanjo oceno kakovosti. Z izbiro ustreznih programov medlaboratorijskih primerjav pokrivamo maksimalno možno število preiskav, ki jih izvajamo. Od ustanovitve, laboratorij sodeluje v Slovenski nacionalni shemi SNEQAS, kjer preverjamo hematološke parametre, POCT hemoglobin in predanalitično oceno kakovosti vzorcev. Vključeni smo tudi v shemo kakovosti RIQAS angleškega proizvajalca Randox, kjer prav tako določamo parametre rdeče krvne slike. Mikrobiološko kontrolo kakovosti na bakterije in glive preverjamo z dvema programoma Labquality finskega proizvajalca Labscala. Pravilnost rezultatov določanja vsebnosti endotoksinov izkazujemo s sodelovanjem v shemi LAL Proficiency testing Program (PTP), proizvajalca Charles River Microbial Solutions iz Dublina.

O rezultatih meritev preverjanja kakovosti krvnih komponent dnevno obveščamo odgovorne v Centru za predelavo krvi. Mesečna poročila pošiljamo vodji Službe vodenja sistema kakovosti in vodji Centra za predelavo krvi, kjer izvedejo evalvacijo rezultatov in predlagajo morebitne ukrepe. Najmanj enkrat letno se sestane Strokovna skupina za obravnavo rezultatov kontrol kakovosti

krvnih komponent. Skupino sestavljajo predstavniki Oddelka za preskrbo s krvjo, Oddelka za diagnostične storitve in Službe za vodenje sistema kakovosti. Naloge strokovne skupine so obravnava rezultatov kontrol kakovosti v polletnem in letnem obdobju , uvajanje sprememb v procesu kontrole kakovosti in podajanje mnenj v primeru strokovnih vprašanj, ki so bila s tega področja naslovljena na ZTM. V letu 2023 smo predlagali uvedbo mikrobiološke kontrole vseh enot trombocitov, ki so bili izdani brez patogene inaktivacije. Naš cilj je, da vsem bolnikom, ki prejmejo naše produkte, zagotovimo maksimalno varno in kakovostno zdravljenje s krvnimi pripravki.

Histovigilanca na OTS – pregled zadnjih 10 let

Katrina Hartman

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šljajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

Katrina.hartman@ztm.si

Javna agencija RS za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP) histovigilanco opredeljuje kot Sistem prepoznavanja, obveščanja in poročanja o neželenih reakcijah in neželenih dogodkih, ki lahko vplivajo na kakovost in varnost tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje, in bi jih lahko pripisali pridobivanju tkiv in celic pri darovalcih, predelavi, shranjevanju tkiv in celic, razdeljevanju tkiv in celic v uporabo, testiranju darovalcev ter uporabi tkiv in celic pri zdravljenju.

Zavod RS za transfuzijsko medicino (ZTM) je postal Ustanova za tkiva in celice marca 2009. S tem je ZTM pridobil dovoljenje za opravljanje dejavnosti preskrbe s človeškimi tkivi in celicami. Imenovana je bila odgovorna oseba za dejavnost in objavljen je bil organizacijski postopek (OP) Histovigilanca. Sprva je bila to dejavnost Oddelka za preskrbo s krvjo, maja 2014 pa je bil ustanovljen Oddelek za terapevtske storitve (OTS), ki je prevzel vse postopke povezane s preskrbo s tkivi in celicami.

Na OTS smo vzpostavili histovigilančni sistem, ki je opisan v dokumentu Histovigilanca. Vsako odstopanje zabeležimo v računalniški program BusinessConnect (BC) kot neskladnost po OP Beleženje neskladnosti. Odstopanje ocenimo po teži vpliva na darovalca oziroma prejemnika in razvrstimo v naslednje rubrike: neskladnost (brez vpliva), neželena reakcija / dogodek (možen vpliv) ter huda neželena reakcija / dogodek, ki ima (lahko) pomemben vpliv. Med histovigilančne primere štejemo hude neželene reakcije / dogodke (ali sum nanje). Te sporočimo Javnemu zavodu RS za presaditve organov in tkiv (Slovenija – Transplant (ST)) na obrazcu, ki je del pravilnika. ST jih posreduje JAZMP.

Na OTS raziščemo vzroke in posledice reakcije / dogodka in ugotovimo težo vpliva na darovalca oziroma prejemnika. Končne ugotovitve – ali je šlo za hud neželen dogodek / reakcijo in ali je bil / bila povezana s tkivi in celicami, posredujemo ST.

Poleg celičnih terapij na OTS od leta 2018 izdelujemo tudi zdravila za napredna zdravljenja (ZNZ). Kot zahteva zakon, smo vzpostavili farmakovigilančni sistem, ki je opisan v dokumentu Farmakovigilanca zdravila za napredno zdravljenje. Farmakovigilanca zagotavlja zaznavanje, zbiranje podatkov in vodenje dokumentacije o neželenih učinkih zdravila. Odgovorna oseba za sproščanje posameznih serij zdravil prijavo neželenega učinka pregleda, oceni okoliščine in stopnjo oziroma težo vpliva na bolnika ter glede na to ustrezno ukrepa. Prijave neželenih učinkov in zaključke posredujemo JAZMP. Vsa odstopanja tudi na področju ZNZ vnesemo v BC.

Farmakovigilančne in histovigilančne primere vodimo skupaj, vsi so vpisani v BC.

V 10 letih smo na OTS zabeležili tri hude neželene dogodke in dve hudi neželeni reakciji (obe farmakovigilančni primer).

Spreminjajoči se svet in izzivi pri merilih za izbor krvodajalcev (ZTMS)

Emerging Infectious Threats to Blood Safety

Ryanne Lieshout-Krikke

Sanquin, Plesmanlaan 125, 1066 CX Amsterdam www.sanquin.org

r.lieshout@sanquin.nl

Donor selection, donation testing and processing are important steps to prevent transfusion transmission. Although the transfusion risk of the major transfusion transmitted infections for HIV, hepatitis C and hepatitis B declined, the increasing risk of emerging infectious diseases (EIDs) is of concern to blood safety. Not only the appearance of new outbreaks of EIDs, but also the increased mobility of donors, and the awareness of these infections and insights in risks for blood transfusion attribute to this concern. An emerging infectious disease is an infectious disease that has newly appeared in a population, or that has been known for some time but is rapidly increasing in incidence or geographic range, or threatens to emerge in the near future. Socio-economic, environmental and ecological factors are involved in the (re-) emergence of infectious diseases. Major features of EID are vector-borne (such as West Nile fever or dengue) or zoonotic diseases (hepatitis E, Q-fever or Bovine spongiform encephalopathy).

For risk assessment the European Up-Front Risk Assessment Tool (EUFRAT) can be used to calculate the risk for blood transfusion. EUFRAT is specifically designed to analyse EID outbreaks and to estimate the associated risk for blood recipients. This web-based tool, developed in 2011 for the ECDC, is a ready-to-use application providing stepwise estimates of the risk of receiving contaminated blood in outbreak situations in Europe. If travel characteristics are known, this tool can also be used to estimate the risk from returning travelling donors.

To safeguard the blood supply, the risk of infectious donations during outbreaks needs to be monitored continuously. Surveillance and reporting of EIDs (including suspected transmission via blood products), public health measures in controlling (local) outbreaks and awareness in blood establishments by collaborating with national and international partners are important aspects to be able to implement the proper blood safety measures in a timely manner.

Ocenjevanje trenutnega tveganja za prenos variantne Creutzfeldt-Jakobove bolezni s transfuzijo v Evropi

Dragoslav Domanović

European Blood Alliance, Amsterdam, Nizozemska

d.domanovic@europeanbloodalliance.eu

Uvod

Variantna Creutzfeldt-Jakobova bolezen (vCJB) je neozdravljiva nevrodegenerativna zoonoza iz skupine prionskih bolezni imenovanih prenosljive spongiformne encefalopatije (TSE). Bolezen so odkrili leta 1996 v Združenem kraljestvu (1). Za vCJB so značilni zgodnji psihiatrični znaki, vztrajni boleči senzorični simptomi, cerebelarna ataksija in demenca, ki se končajo s smrtnim izidom. Znaki bolezni so posledica agregacije in kopičenja konformacijsko spremenjene prionske beljakovine (PrP^{Sc}) v možganih, kar povzroči klasične spongiformne spremembe, izgubo nevronov in astrogliozo.

Med leti 1995 in 2021 so iz sedmih evropskih držav poročali o 223 primerih vCJB (159 potrjenih in 64 verjetnih primerov). Pri tem je največ primerov (178 primerov) bilo v Združenem kraljestvu in Franciji (28 primerov). Po svetu so zabeležili skupno 233 primerov vCJB (2).

V večini primerov vCJB gre za primaren prenos z uživanjem govejega mesa okuženega s povzročitelji goveje spongiformne encefalopatije (BSE). Med sekundarne prenose sodijo štiri domnevni/verjetni primeri prenosa s transfuzijami okuženih pripravkov eritrocitov in en možen primer s koncentratu faktorja VIII. Poleg tega je bil vsaj en primer vCJB povezan z izpostavljenostjo pri delu v laboratoriju. Ni dokazov o jatrogenem prenosu vCJB med operacijami, zobozdravstvenimi posegi, endoskopijami, porodom ali presaditvijo organov, celic ali tkiv (3).

Preprečevanje prenosa s transfuzijo

Nadzor vstopa okuženega mesa in tkiv v prehranjevalno verigo je učinkovit ukrep za preprečevanje primarnega prenosa vCJB. Ukrepi za preprečevanje sekundarnega prenosa vCJB s transfuzijo pa obsegajo trajni odklon krvodajalcev, pri katerih obstaja tveganje za izpostavljenost z uživanjem hrane ali s transfuzijo v državah, ki so imele veliko tveganje za prenos vCJB od leta 1980 do 1996 kot so Združeno Kraljestvo in Francija. Prav tako lahko zmanjšamo potencialno okuženost darovane krvi z odstranitvijo levkocitov ali odstranitvijo prionov iz plazme ali zdravil iz plazme. Leta 1996 je Združeno kraljestvo preventivno prepovedalo uporabo domače plazme za proizvodnjo zdravil iz plazme.

Kljub >20-letni odsotnosti novih primerov, je prenos vCJB s transfuzijo še vedno teoretično možen. Inkubacijska doba bolezni je dolga in je odvisna od genotipa okuženega pri kodonu 129 *PRNP*. Po okužbi s hrano lahko povprečna inkubacijska doba traja do 15 let pri metioninskih homozigotih (MM) ali pa več desetletij pri valin-metionin heterozigotih za valin-metionin (MV) in homozigoti za valin homozigoti (VV) (4). Glede na tako dolgo inkubacijsko dobo lahko imamo v populaciji tihe prenašalce zlasti med posamezniki MV in VV, ki lahko prenašajo bolezen preko darovane krvi. Raziskava med članicami združenja EBA (European Blood Alliance) je pokazala veliko variabilnost pri odklonu krvodajalcev z namenom zmanjšanja tveganja prenosa vCJB s transfuzijo. Največje razlike so pri trajnem odklonu krvodajalcev zaradi potovanja in bivanja v Združenem kraljestvu, redkeje tudi v Franciji in na Irskem in glede trajanja bivanja v teh državah (3, 6 ali 12 mesecev) (5).

Leta 2021 je Združeno kraljestvo na podlagi ocene tveganja s verjetnostim modeliranjem odpravilo prepoved uporabe domače plazme za proizvodnjo pripravkov imunoglobulinov in leta 2023 tudi albuminov (6). Odločitvi sta spodbudili več držav k ponovni oceni tveganja prenosa vCJB s transfuzijo in spremembi meril za odklon krvodajalcev na podlagi prebivanja oziroma prejemanja transfuzije v državah z visokim tveganjem za nastanek vCJB v preteklosti, kot je Združeno kraljestvo. ECDC trenutno priporoča državam članicam EU, da ocenijo tveganja in ustrezno

revidirajo merila za odklon. Poleg tega zakonodaja EU in smernice EDQM podpirata takšno možnost.

Ocena tveganja prenosa vCJB s transfuzijo

Doslej so nacionalne transfuzijske službe na Irskem, v Avstraliji, Kanadi, Hong Kongu in Novi Zelandiji ter regulatorni organi ZDA in Izraelu ponovno ocenili tveganje za prenos vCJB s transfuzijo zaradi geografske izpostavljenosti in izpostavljenosti transfuziji v državah z visokim tveganjem. Na tej podlagi so njihovi zdravstveni organi spremenili merila za odklone krvodajalcev.

To je sprožilo vprašanje, kako pristopiti k oceni tveganja za prenos vCJB s transfuzijo v Evropi. Zdi se, da bi bilo smiselno pripraviti skupne smernice in ocene tveganja vCJB na evropski ravni, namesto individualnega pristopa vsake države. Dosedanje odločitve o spremembah odklonov krvodajalcev so temeljile na kvalitativnih in kvantitativnih ocenah tveganja. Pri kvalitativni oceni so ugotovljena tveganja analizirali, ovrednotili in opredelili na podlagi dokazov o verjetnosti pojava in njegovih posledicah. Pri tem so upoštevali znanstvene in epidemiološke podatke, vpliv odstranjevanja levkocitov iz krvnih komponent, analize tveganja z verjetnostnim modeliranjem in dejstvo, da so bili samo štiri primeri vCJB pridobljeni s transfuzijo. Za kvantitativni pristop, ki omogoča pridobitev podrobnih kvantitativnih podatkov na državni ravni, so uporabili oceno tveganja z verjetnostnim modeliranjem. Poznamo več kvantitativnih verjetnostnih analiz tveganja, ki so bile izhodišče za spremembe preventivnih posegov: tri so opravile nacionalne transfuzijske ustanove v Avstraliji, Kanadi (CBS & Héma-Québec) in Novi Zelandiji drugi dve pa nacionalni regulativni organi Združenega kraljestva in ZDA.

Tabela 1. Nekatere ocene tveganja transfuzijskega prenosa vCJB z verjetnostnim modeliranjem.

	MHRA (7)	FDA (4)	ARC LIFE BLOOD (8)	CBS – Héma-Québec (9)
Tarčna ocena	Verjetno število primerov prenosa vCJB s transfuzijo v	Tveganje prenosa vCJB s transfuzijo eritrocitov v letu 2011 in	Prevalenca nediagnosticirane, predsimpltomatske	Tveganje za darovanje krvi okužene z vCJB, v kohorti 10 milijonov

	naslednjih 50 letih	kumulativno tveganje od 1980 do 2011	vCJB v populaciji v tekočem letu	darovalcev v obdobju 85 let
Ključni vhodni parameter: prevalenca vCJB v Združenem kraljestvu	+	+	+	+
Monte Carlo simulacija	+	+	+	+
Analiza občutljivosti	n.p.	+	+	+
Prag tolerance	n.p.	n.p.	< 1prenos na 5 milijonov na transfundirano enoto	n.p.
Ocenjeno tveganje kot število primerov na transfundirano komponento krvi (TKK)	0-62 kliničnih primerov vCJB po transfuziji 90 milijonov TKK v obdobju 50 let	Od 1/134 milijonov do 1 / 480,000 transfuzij eritrocitov	Tveganje za darovanje okužene krvi: 1/29,900,000 TKK Tveganje za prenos: 1/389,000,000 TKK Tveganje za klinično bolezen: 1/1,450,000,000 BCT	Tveganje za darovanje okužene krvi: 1 /157,000,000 TKK (HQ) 1 /21,000,000 TKK(CBS)

Legenda: ARC = Australian Red Cross; CBS = Canadian Blood Services; FDA = US Food and Drug Administration; MHRA = Medicines & Healthcare Products Regulatory Agency; n.p. = ni podatka.

V tabeli 1 so prikazane nekatere kvantitativne analize, ki so obravnavale tveganje za darovanje okužene krvi, za prenos okužbe in za nastanek klinične bolezni. Ključni vhodni podatki modelov so bile epidemiološke ocene razširjenosti vCJB v Združenem kraljestvu ter parametri, specifični

za državo, povezani z darovalci, darovanjem in vCJB. Rezultati so bili ustvarjeni s simulacijami Monte Carlo. Podobne analize so bile izvedene tudi za oceno tveganja prenosa vCJB z zdravili, pridobljenimi iz plazme, ali uporabljene za oceno stroškovne učinkovitosti prionske filtracije. Vsi ti pristopi modeliranja zahtevajo več vhodnih parametrov in strokovnjake za verjetnostno modeliranje.

Pri oceni in obvladovanju tveganja se treba zavedati negotovosti razpoložljivih znanstvenih informacij o vCJB in ponovno oceniti tveganja, če se pojavijo novi primeri bolezni.

Zaključek

Znanstveni in epidemiološki podatki o vCJB ter spremembe meril za odklanjanje krvodajalcev v nekaterih državah kažejo, da je tudi v evropskih državah upravičeno oceniti trenutno tveganje za prenos vCJB s transfuzijo in v skladu z ugotovitvami preveriti veljavnost ukrepov za njeno preprečevanje. Možna je uporaba tako kvalitativne kot kvantitativne metode analize tveganja ob upoštevanju vseh negotovosti, povezanih z boleznijo.

Literatura

1. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*. 1996; 347(9006):921-5.
2. Creutzfeldt Jakob Disease International Surveillance Network. vCJD cases worldwide. Edinburgh: The University of Edinburgh; 2021. [Cited 2024 March 20] Available at: <https://www.eurocjd.ed.ac.uk/data>
3. Peden AH, Barria MA. Chapter 12: risk of transmission of Creutzfeldt–Jakob disease by blood transfusion. *Prions and diseases*. 2nd ed. Switzerland: Springer; 2023. p. 213–37.
4. Yang H, Gregori L, Asher DM, Epstein JS, Anderson SA. Risk assessment for transmission of variant Creutzfeldt–Jakob disease by transfusion of red blood cells in the United States. *Transfusion*. 2014;54: 2194–11.
5. European Blood Alliance. Overview strategies for blood donor selection vCJD. 2023. [cited 2024 March 20]. Available at: <https://europeanbloodalliance.eu/resources/overview-strategies-for-blood-donor-selection-vcjd/>
6. Government of the United Kingdom, Department of Health and Social Care. Ban lifted to allow UK blood plasma to be used for life-saving treatments. Press release. London: Government of the United Kingdom; 2021. [Cited 2024 March 20]. Available at: <https://www.gov.uk/government/news/ban-lifted-to-allow-uk-blood-plasma-to-be-used-for-life-saving-treatments>
7. Medicines & Healthcare Products Regulatory Agency. Critical risk assessment report: use of UK plasma for the manufacture of immunoglobulins and vCJD risk. London: Government of the United Kingdom; 2021. [Cited 2024 March 20]. Available from:

<https://www.gov.uk/government/publications/critical-risk-assessment-report-use-of-uk-plasma-for-the-manufacture-of-immunoglobulins-and-vcj-d-risk/critical-risk-assessment-report-use-of-uk-plasma-for-the-manufacture-of-immunoglobulins-and-vcj-d-risk>

8. McManus H, Seed CR, Hoad VC, Kiely P, Kaldor JM, Styles CE, et al. Risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease transmission by blood transfusion in Australia. *Vox Sang* 2022; 117(8):1016-1026.
9. Pozzo di Borgo A, Germain M, O'Brien SF, Delage G, Renaud C, Lewin A. Risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease in a simulated cohort of Canadian blood donors. *Vox Sang*. 2023 Sep; 118 (9):738-745.
10. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*. 2004; 363 (9407):417-21.
11. Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet*. 2004; 364(9433):527-9. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673604168116>
12. Wroe SJ, Pal S, Siddique D, Hyare H, Macfarlane R, Joiner S, et al. Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet*. 2006; 368(9552):2061-7. Available at: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(06\)69835-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(06)69835-8/fulltext)
13. Health Protection Agency. Fourth case of variant CJD associated with blood transfusion (press release). Press release, 18 January 2007. http://www.hpa.org.uk/hpa/news/articles/press_releases/2007/070118_vCJD.htm
14. Peden A, McCardle L, Head MW, Love S, Ward HJ, Cousens SN, et al. Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemophilia*. 2010; 16(2):296-304. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2516.2009.02181.x>
15. Brandel J-P, Vlaicu MB, Culeux A, Belondrade M, Bougard D, Grznarova K, et al. Variant Creutzfeldt–Jakob disease diagnosed 7.5 years after occupational exposure. *New England Journal of Medicine*. 2020; 383(1):83-5. Available at: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMc2000687>
16. Yang H, Huang Y, Gregori L, Asher DM, Bui T, Forshee RA, et al. Geographic exposure risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease in US blood donors: a risk-ranking model to evaluate alternative donor-deferral policies. *Transfusion* 2017; 57(4):924-932. doi: 10.1111/trf.13971.
17. Medicines & Healthcare Products Regulatory Agency. Critical risk assessment report: use of UK plasma for the manufacture of immunoglobulins and vCJD risk. London:

Government of the United Kingdom; 2021. Available from:
<https://www.gov.uk/government/publications/critical-risk-assessment-report-use-of-uk-plasma-for-the-manufacture-of-immunoglobulins-and-vcj-d-risk/critical-risk-assessment-report-use-of-uk-plasma-for-the-manufacture-of-immunoglobulins-and-vcj-d-risk>

Obvladovanje Creutzfeldt-Jakobove bolezni v Sloveniji

Brina Šebez¹, Valentina Filipović Samec¹, Nuška Čakš Jager², Klara Železnik¹, Polonca Mali¹

¹Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM)

²Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ)

brina.sebez@ztm.si

UVOD

Creutzfeldt-Jakobova bolezen (CJB) je progresivna in neozdravljiva bolezen ljudi, ki spada v skupino prionskih bolezni. Za transfuzijsko medicino je pomembna variantna CJB (vCJB), zoonotska različica bovine spongiformne encefalopatije (BSE), prionske bolezni goveda, ki je vstopila v človeško prehranjevalno verigo predvsem v Veliki Britaniji (VB), na Irskem in v Franciji med letoma 1980 in 1996 ter povzročila svetovno krizo z resnimi zdravstvenimi in gospodarskimi posledicami. Inkubacijska doba vCJB je v povprečju ocenjena na okoli 10 let, lahko pa traja tudi od 5 do 42 let.

Okužbo z vCJB po transfuziji krvi so pri ljudeh do sedaj zabeležili štirikrat v VB. V vseh štirih primerih so bolniki prejeli transfuzijo eritrocitov pred uvedbo obvezne levkoredukcije v letu 1999. Iz VB so poročali tudi o enem možnem prenosu vCJB s faktorjem VIII, pridobljenim iz plazme.

Zaradi izbruha epidemije BSE v VB so v tej državi sprejeli stroge ukrepe. Leta 1998 so prepovedali uporabo plazme, zbrane v VB, za proizvodnjo plazemskih produktov in za klinično uporabo pri bolnikih, rojenih po letu 1995, ter jo začeli uvažati iz držav z nizko prevalenco vCJB. Po štirih desetletjih od začetka epidemije so bile v VB potrebe po neodvisnosti pri krvnih pripravkih in plazemskih produktih vedno večje, prav tako pa je potekel čas inkubacije vCJB, ki je ocenjen na maksimalno okoli 40 let. Leta 2021 so ocenili, da ta ukrep ni več potreben.

Ta odločitev je spodbudila več držav, vključno z Irsko, ZDA, Kanado, Avstralijo, Novo Zelandijo in Izraelom, da so ponovno ocenile tveganje vCJB in zrahljale ukrepe prepovedi darovanja pri krvodajalcih na podlagi geografske izpostavljenosti in izpostavljenosti transfuziji v državah z visokim tveganjem za vCJB.

V Evropi še ni enotne strategije sproščanja ukrepov. Po priporočilih ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) lahko posamezne evropske države samostojno opredelijo tveganje za prenos vCJB s transfuzijo krvi ter posodobijo ukrepe pri krvodajalcih. Najnovejše priporočilo EBA (European Blood Alliance) je, da je trajni odklon krvodajalcev na podlagi geografske izpostavljenosti CJB disproporcionalen s tveganjem za prenos vCJB s krvnimi pripravki.

NAMEN

Namen je predstaviti spremljanje CJB v Sloveniji in tujini ter pomen vCJB za transfuzijsko medicino.

METODE

Pregledali smo literaturo z opisi števila primerov CJB pri ljudeh v tujini in pridobili podatke NIJZ o prijavah prionskih bolezni v Sloveniji. Ocenili smo število krvodajalcev v Sloveniji, ki so bili odklonjeni zaradi CJB ali stika s to boleznijo. Pregledali smo ustreznost ukrepov zaradi CJB za zagotovitev varne krvi v Sloveniji in tujini ter spremembe le teh v zadnjih letih.

REZULTATI

CJB smo v Sloveniji po Zakonu o nalezljivih boleznih obvezani slediti, prijavljati klinične sume, analizirati dejavnike tveganja in izvajati potrebne ukrepe za preprečevanje prenosa. Slovenija aktivno spremlja prionske bolezni od leta 1995 in je sodelovala v projektu EUROCCJD (The European and Allied Countries Collaborative Study Group of CJD), nato pa se je vzpostavil sistem spremljanja vCJB na ECDC, v katerega je vključena tudi Slovenija kot članica Evropske unije. Od leta 2007 pri NIJZ deluje Strokovna skupina za epidemiološko spremljanje CJB v Sloveniji (SSCJB). Skupino sestavlja tim strokovnjakov s področja psihiatrije, nevrologije, nevropatologije, infektologije, transfuziologije, epidemiologije in veterinarske medicine. Po Odredbi o preventivnih ukrepih v zvezi s transmisivnimi spongiformnimi encefalopatijami je v primeru suma na katerokoli

obliko prionskih bolezni obvezna obdukcija umrlega. Nevrolog, centralni koordinator, na osnovi suma na prionsko bolezen sodeluje pri diagnostiki, lečeči zdravniki pa so dolžni spoštovati zakonske odredbe o posmrtni diagnostiki.

Kmalu po prvih ukrepih, sprejetih na področju varnosti hrane in zdravil ter pri obravnavi bolnikov s sumom na prionske bolezni, smo tudi na ZTM sprejeli preventivne ukrepe za zagotavljanje varne krvi, saj zanesljivi presejalni testi krvi na CJB še ne obstajajo.

Leta 2009 smo na državni ravni uvedli obvezno levkoredukcijo enot krvi, merila, pomembna za krvodajalce, pa so od leta 2007 zapisana v Zakonu o preskrbi s krvjo. Trajni odklon krvodajalcev je v veljavi pri:

- osebah z družinsko anamnezo tveganja za pojav CJB (sorodniki v 1 kolenu oseb, ki imajo sporadično ali dedno obliko CJB),
- osebah s presajeno roženico ali trdo možgansko opno ali osebah, ki so bile v preteklosti zdravljene s preparati na osnovi človeške hipofize,
- **osebah, ki so v obdobju med letoma 1980 in 1996 bivale** v državah s povečanim tveganjem za vCJB (**VB, Irska**) **več kot 12 mesecev** ali so bile **operirane/prejele transfuzijo krvi po letu 1980** – t. i. **geografski odklon**.

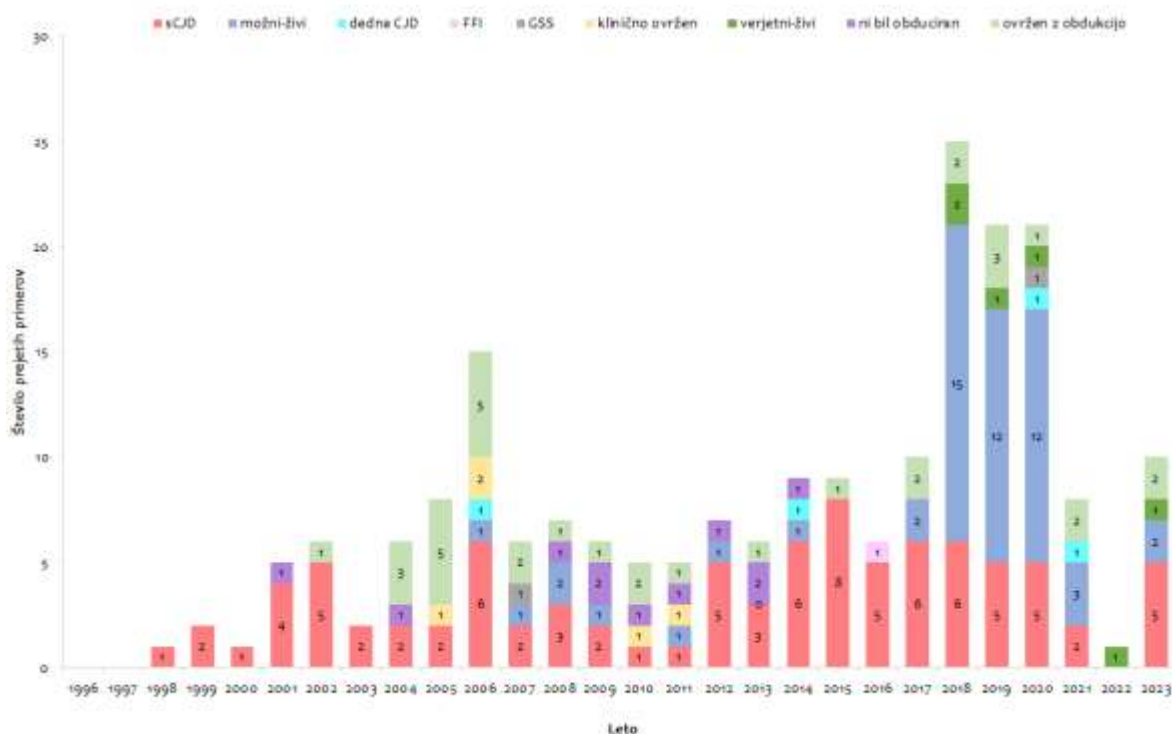
V obdobju 1996 - 2023 je bilo v Sloveniji prijavljenih 208 primerov prionskih bolezni. Od tega je bilo 90 primerov potrjenih z obdukcijo kot sporadična CJB (sCJB) z incidenco 1,6 primera na milijon prebivalcev na leto, kar je primerljivo z drugimi evropskimi državami. V tem času smo potrdili tudi štiri primere dedne oblike CJB (dCJB), dva primera Gerstmann-Sträussler-Scheinkerjev sindroma (GSS) ter primer Smrtne družinske nespečnosti (FFI – Fatal familial insomnia). V Sloveniji vCJB še ni bila dokazana. Epidemiološka situacija v Sloveniji za omenjeno obdobje je prikazana v tabeli 1 in grafu 1.

Tabela 1: Epidemiološka situacija prionskih bolezni v Sloveniji 1996 - 2023

1996 - 2023	
dedna CJB	4
FFI (smrtna družinska nespečnost)	1
klinično ovržen	5
GSS	2
možni - živi	54
verjeten - živi	6
ni bil obduciran	11
ovržena z obd.	35
sCJB	90
Skupaj	208

Vir: NIJZ

Graf 1: Epidemiološka situacija prionskih bolezni v Sloveniji po letih, 1996 - 2023 (n=208)



Vir: NIJZ

Med leti 1995 in 2023 je bilo v VB potrjenih 178 primerov vCJB, 30 v Franciji, 5 v Španiji, 4 na Irskem in v ZDA, 3 na Nizozemskem in v Italiji, 2 v Kanadi in na Portugalskem ter 1 primer na Tajvanu, Japonskem in v Saudski Arabiji.

V svetu ni zabeleženih primerov vCJB pri ljudeh, rojenih po letu 1989. Leta 2016 je bil zadnji zabeležen prenos vCJB s hrano. Po letu 1999, ko je bila uvedena levkoredukcija polne krvi, ni primerov prenosa vCJB preko eritrocitov ali ostalih krvnih komponent. Po uvedbi dodatnih nanofiltrov v procesu frakcionaže plazme, ki odstranijo prione, ni zabeleženega prenosa vCJB preko plazemskih produktov.

V zadnjih 40 letih smo v Sloveniji na podlagi ukrepov za preprečevanje prenosa CJB, sprejetih pri krvodajalcih, trajno odklonili okoli 30 krvodajalcev.

ZAKLJUČEK

Bolezen vCJB v svetu ne predstavlja več tveganja, in sicer zaradi strogih in učinkovitih ukrepov na področju hrane, zdravlil in krvi ter zaradi izteka inkubacijske dobe. V Sloveniji primera bolnika z vCJB še nismo zabeležili. Glede na naše in tuje podatke je tveganje prenosa vCJB s komponentami krvi v Sloveniji danes zanemarljivo. V Sloveniji je bil zaradi t. i. geografskega odklona trajno odklonjen procentualno zelo nizek delež krvodajalcev.

Po naši in tuji oceni je opustitev omejitev darovanja krvi zaradi vCJB varna in učinkovita strategija za povečanje baze krvodajalcev brez povečanega tveganja za prenos vCJB s transfuzijo krvi. Tudi v Sloveniji se v skladu s priporočili ECDC in EBA nagibamo k opustitvi trajnega odklona za krvodajalce, ki so bivali, bili operirani ali prejeli transfuzijo med letoma 1980 in 1996 v VB ali na Irskem.

LITERATURA

1. Čakš Jager N, Popovič M, Blaško Markič M, Kraigher A. Analysis of 22 Years of Surveillance for Prion Diseases in Slovenia, 1996 to 2017. *Zdr Varst.* 2018;57(4): 227–233.
2. Direktiva komisije 2004/33/ES z dne 22. marca 2004 o izvajanju Direktive 2002/98/ES Evropskega parlamenta in Sveta glede nekaterih tehničnih zahtev za kri in komponente krvi. (2004, Marec). Uradni List Evropske Unije.
3. ECDC. The risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease transmission via blood and plasma-derived medicinal products manufactured from donations obtained in the United Kingdom. 2021. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/risk-assessment-risk-variant-creutzfeldt-jakob-disease-transmission-blood>.
4. ECDC. Variant Creutzfeldt-Jakob disease - Annual Epidemiological Report for 2021. 2021. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/variant-creutzfeldt-jakob-disease-annual-epidemiological-report-2021>.

Testiranje krvodajalcev na okužbe, ki se prenašajo s krvjo (ZTMS)

Presejalno testiranje krvodajalcev na označevalce okužb in prijave sumov na potransfuzijske okužbe v Sloveniji od 2014 do 2023

Klara Železnik

Zavod RS za transfuzijsko medicino

klara.zeleznik@ztm.si

Uvod. Presejalno testiranje krvodajalcev je najučinkovitejši ukrep za preprečevanje prenosa povzročiteljev nalezljivih bolezni s transfuzijo. Testiranje na označevalce okužb izvajamo v skladu z zakonodajo in nacionalno sprejetimi algoritmi. V sistemu hemovigilance beležimo tudi prijave in reševanje primerov sumov s transfuzijo prenešenih okužb.

Cilj in metode. Predstavljamo desetletne (2014-2023) podatke o presejalnem testiranju krvodajalcev na označevalce okužb in o prijavah sumov potransfuzijskih okužb. V opazovanem obdobju smo izvajali serološko presejalno testiranje z encimsko-imunsko metodo. Neposredno zaznavanje virusnega genoma smo izvajali s testiranjem NAT (*ang.* Nucleic Acid Testing) z metodo TMA (*ang.* Transcription Mediated Amplification).

Rezultati. Od leta 2014 do leta 2023 smo v Sloveniji testirali 859.431 odvzemov krvi, od tega je 84.331 odvzemov pripadalo krvodajalcem, ki so kri darovali prvič. S presejalnim testiranjem smo okužbo odkrili pri 146 krvodajalcih, pri čemer smo 85 (58%) okužb odkrili pri novih krvodajalcih. Prevalenca okužb med vsemi testiranimi enotami je bila za virus hepatitisa B (HBV) 1:12.639, za virus hepatitisa C (HCV) 1:39.065, za HIV 1:95.492 in za sifilis 1:18.286 (Tabela 1). Prevalenca odkritih okužb je bila višja med odvzemi pri novih krvodajalcih (1:992) v primerjavi z rednimi krvodajalci (1:12.707) (Tabela 2).

V opazovanih letih smo obravnavali 24 krvodajalcev, pozitivnih samo pri testiranju NAT (0-6 na leto). Pri vseh 24 krvodajalcih je bila ugotovljena prisotnost HBV DNA brez zaznavnega HBsAg, pri

čemer je šlo v 22 primerih za prikrito okužbo s HBV (okultna B infekcija, OBI) in v 2 primerih za okužbo v diagnostičnem oknu. Najvišja prevalenca odvzemov, pozitivnih samo pri testiranju NAT, je bila leta 2020 in je znašala 1:12.929.

Tabela 1: Število in prevalenca HBV, HCV, HIV in sifilis-pozitivnih enot krvi

Leto	Št. test. enot	Virus hepatitisa B (HBV)			Virus hepatitisa C (HCV)			Virus HIV			Treponema pallidum (sifilis)		
		Število odkritih okužb	Prevalenca okužb med odvzetimi enotami	Pogostost na 10 ⁵ odvzetih enot	Število odkritih okužb	Prevalenca okužb med odvzetimi enotami	Pogostost na 10 ⁵ odvzetih enot	Število odkritih okužb	Prevalenca okužb med odvzetimi enotami	Pogostost na 10 ⁵ odvzetih enot	Število odkritih okužb	Prevalenca okužb med odvzetimi enotami	Pogostost na 10 ⁵ odvzetih enot
2014	87.826	8N, 1R	1 : 9.758	10,25	4N	1 : 21.957	4,55	3R	1 : 29.275	3,42	1N, 3R	1 : 21.957	4,55
2015	87.697	3N, 4R	1 : 12.528	7,98	3N, 1R	1 : 21.924	4,56	0	/	/	3N, 1R	1 : 21.924	4,56
2016	89.888	6N, 3R	1 : 9.988	10,01	3N	1 : 29.963	3,34	1N	1 : 89.888	1,11	6N, 1R	1 : 12.841	7,79
2017	89.580	5N	1 : 17.916	5,58	1N	1 : 89.580	1,12	0	/	/	4N, 1R	1 : 17.916	5,58
2018	87.640	4N, 1R	1 : 17.528	5,71	2N, 1R	1 : 29.213	3,42	0	/	/	1N, 1R	1 : 43.820	2,28
2019	85.431	6N, 2R	1 : 10.679	9,36	0	/	/	0	/	/	2N, 4R	1 : 14.239	7,02
2020	77.573	3N, 6R	1 : 8.619	11,6	2N	1 : 38.787	2,58	1N, 2R	1 : 25.858	3,87	1N, 3R	1 : 19.393	5,16
2021	84.416	4N, 3R	1 : 12.059	8,29	2N	1 : 42.208	2,37	1N	1 : 84.416	1,18	2N, 6R	1 : 10.552	9,48
2022	84.487	3N, 2R	1 : 16.897	5,92	1N, 1R	1 : 42.244	2,37	1R	1 : 84.487	1,18	1N, 3R	1 : 21.122	4,73
2023	84.893	2N, 2R	1 : 21.223	4,71	1N	1 : 84.893	1,18	0	/	/	2N, 1R	1 : 28.298	3,53
Skupaj	859.431	68	1:12.639	7,91	22	1:39.065	2,56	9	1:95.492	1,05	47	1:18.286	5,47
Letno povprečje	85.943	7	1 : 12.278	8,14	2	1 : 42.972	2,33	1	1 : 85.943	1,16	5	1 : 17.189	5,82

Legenda: N: novi krvodajalec, R: redni krvodajalec

Tabela 2: Pogostost zaznavanja okužb pri novih in rednih krvodajalcih - vsi označevalci po letih

LETO	Št. testiranih enot krvi	Št. novih dajalcev	Št. pozitivnih odvzemov			Prevalenca okužb med odvzetimi enotami					
			NOVI dajalci	REDNI dajalci	SKUPAJ	NOVI dajalci	NOVI dajalci (št.okužb/10 ⁵ enot)	REDNI dajalci	REDNI dajalci (št.okužb/10 ⁵ enot)	VSI ODVZEMI	VSI ODVZEMI (št.okužb/10 ⁵ enot)
2014	87.826	9.596	13	7	20	1 : 738	135,47	1 : 11.176	8,95	1 : 4.391	22,77
2015	87.697	8.654	9	6	15	1 : 962	104	1 : 13.174	7,59	1 : 5.846	17,1
2016	89.888	9.548	16	4	20	1 : 597	167,57	1 : 20.085	4,98	1 : 4.494	22,25
2017	89.580	9.514	10	1	11	1 : 951	105,11	1 : 80.066	1,25	1 : 8.144	12,28
2018	87.640	9.822	3	7	10	1 : 3.274	30,54	1 : 11.117	9	1 : 8.764	11,41
2019	85.431	9.324	10	4	14	1 : 932	107,25	1 : 19.027	5,26	1 : 6.102	16,39
2020	77.573	6.643	7	11	18	1 : 949	105,37	1 : 6.448	15,51	1 : 4.310	23,2
2021	84.416	6.502	9	9	18	1 : 722	138,42	1 : 8.657	11,55	1 : 4.690	21,32
2022	84.487	7.104	3	9	12	1 : 2.368	42,23	1 : 8.598	11,63	1 : 7.041	14,2
2023	84.893	7.624	5	3	8	1:1.525	66,58	1:25.756	3,88	1 : 10.612	9,42
Skupaj	859.431	84.331	85	61	146	1 : 992	100,79	1 : 12.707	7,87	1 : 5.887	16,99

V zadnjih desetih letih so lečeči zdravniki prijavili sum na potransfuzijsko okužbo pri 12 bolnikih (6 primerov prenosa HBV, 2 primera prenosa HCV, 3 primeri prenosa citomegalovirusa in 1 primer prenosa *Anaplasma phagocytophylum*).

Od vseh prijavljenih sumov prenosa smo le v 1 primeru zanesljivo potrdili prenos HBV s transfuzijo. Ob raziskovanju primera smo dodatno retrogradno identificirali še dva zanesljiva in en verjeten prenos HBV (pri bolniku HBV DNA ni bila več zaznavna in zato primerjava virusov krvodajalca in bolnika ni bila več mogoča). Dotični krvodajalec je bil torej vključen v 3 zanesljive in 1 verjeten primer prenosa HBV.

V 2 prijavljenih primerih suma prenosa HBV smo zaključili, da je bil prenos HBV s transfuzijo verjeten. Zaradi nizkega virusnega bremena pri krvodajalcu nismo mogli zaznati HBV DNA in potrditi genetske identičnosti virusov prejemnika in krvodajalca, smo pa potrdili genetsko

identičnost virusov pri obeh prejemnikih (genotip D2, 99,9% ujemanje nukleotidnega zaporedja), kar nakazuje skupen izvor okužbe.

V opazovanem obdobju nismo potrdili primera okužbe pri bolniku, katere vzrok bi bila bakterijska kontaminacija komponente.

Zaključki. Presejalno testiranje krvodajalcev je učinkovit ukrep za preprečevanje prenosa okužb na prejemnika krvi. V zadnjih desetih letih smo s presejalnim testiranjem okužbo odkrili pri 8 do 20 krvodajalcih letno, skupno pri 146. Odkritje okužbe pri krvodajalcu nam omogoča svetovanje, po potrebi napotitev na zdravljenje ter posledično zaščito drugih ljudi. S testiranjem tudi pridobivamo podatke o prekuženosti s posameznimi povzročitelji okužb v določeni populaciji. Glede na naše hemovigilančne podatke je med povzročitelji nalezljivih bolezni, ki jih testiramo rutinsko, največje tveganje prenosa okužbe na bolnika pri HBV. V opazovanem obdobju smo skupno prepoznali 6 primerov zanesljivega ali verjetnega prenosa HBV s komponentami krvi. Glavni dejavniki, ki zmanjšujejo učinkovitost presejalnih programov, so dolžina diagnostičnega okna, omejena občutljivost testov, mutacije znanih povzročiteljev in neznani oz. novi povzročitelji okužb.

Literatura

Podatki so povzeti in preračunani na podlagi poročil Centra za testiranje krvi dajalcev in hemovigilančnih poročil.

Zaznavanje HBV DNA v anti-HBc reaktivnih vzorcih krvi, ki so HBsAg in HBV DNA negativni pri presejalnem testiranju, z visoko občutljivimi molekularnimi tehnikami

Petra Jovanovič, Klara Železnik

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva ulica 6, 1000 Ljubljana

petra.jovanovic@ztm.si

Uvod

Prenos virusa hepatitisa B (HBV) s transfuzijo je prepoznano tveganje v transfuzijski medicini. Za preprečevanje prenosa okužbe s HBV pri krvodajalcih vsako odvzeto enoto krvi presejalno testiramo na prisotnost HBsAg (encimsko-immunski test) in HBV DNA (*ang.*: nucleic acid testing, NAT). Kljub temu tveganje za prenos okužbe obstaja v obdobju diagnostičnega okna in v primeru okultne okužbe s HBV (OBI). Okultna okužba se lahko razvije po razrešitvi akutne okužbe ali dolgotrajni kronični okužbi s HBV. Za OBI je značilna prisotnost za pomnoževanje sposobne HBV DNA v jetrih in/ali krvi oseb, pri katerih HBsAg ni zaznan, episomalna kovalentno zaprta krožna DNA (cccDNA) pa znotraj jetrnih celic omogoča namnoževanje infektivnih virusnih delcev HBV. OBI diagnosticiramo s testiranjem HBV DNA, kot marker okužbe s HBV pa določamo protitelesa proti beljakovini sredice virusa hepatitisa B (anti-HBc). V letu 2019 smo za določanje prevalence okužbe s HBV pri slovenskih krvodajalcih izvedli presejalno testiranje 5706 enot krvi na prisotnost protiteles anti-HBc. Pri anti-HBc reaktivnih krvodajalcih smo določili tudi prisotnost protiteles anti-HBs, ki v koncentraciji > 100 IE/L do neke mere ponujajo zaščito pred prenosom HBV s transfuzijo. Največje tveganje prenosa HBV s transfuzijo je ob prisotnosti HBV DNA v primeru, da je protiteles anti-HBs < 100 IE/L oz. le-ta niso prisotna. Pri 73 (1,28%) vzorcih, ki so imeli negativen rezultat pri presejalnem testiranju NAT, smo pridobili anti-HBc reaktiven rezultat. 36 (49,32%) izmed njih je imelo prisotnih manj kot 100 IE/L protiteles anti-HBs. Te krvodajalce smo, v skladu s takratnimi smernicami, zaradi premajhne količine zaščitnih protiteles anti-HBs odklonili od nadaljnega darovanja krvi.

Zanimalo nas je, ali lahko z ojačitvenimi tehnikami v teh vzorcih zaznamo prisotnost HBV DNA. Minimalna infektivna doza za prenos HBV s transfuzijo je bila na podlagi primera iz Slovenije določena pri 3 IE HBV DNA/mL. Ocenili so, da bi za uspešno zaznavanje HBV DNA v enotah krvi dajalcev z OBI potrebovali ojačitvene oz. občutljivejše molekularne tehnike z zaznavanjem HBV DNA pri 0,15 IE/mL (LOD - limit of detection).

Namen

Za namen določanja prisotnosti HBV DNA pri anti-HBc reaktivnih krvodajalcih s koncentracijo protiteles anti-HBs < 100 IE/L, ki so bili po presejalnem testiranju NAT negativni, smo vzorce koncentrirali z ultracentrifugiranjem. S študijo smo želeli oceniti preostalo tveganje za prenos okužbe HBV s transfuzijo pri trenutnem presejalnem testiranju.

Material in metode

36 anti-HBc reaktivnih enot krvi, ki so imele manj kot 100 IE/L protiteles anti-HBs smo ultracentrifugirali. Iz vrečk sveže zmrznjene plazme, ki smo jih shranili po testiranju, smo odtočili 50 mL raztopljene plazme v centrifugirke. Vzorce smo najprej centrifugirali na 1000g, 5 min pri 20°C (centrifuga Eppendorf 5804R), da smo odstranili celični material (debris). 27 mL supernatanta smo nato prenesli v polialomerne ultracentrifugirke. Ultracentrifugiranje smo izvedli v ultracentrifugi Optima MAX-XP (Beckman Coulter) s kotnim rotorjem na 250 000g, 3 ure pri 4°C, na Inštitutu za biokemijo in molekularno genetiko Medicinske fakultete v Ljubljani. Usedline smo raztopili v vodi brez nukleaz (1,2 mL) in testirali na analizatorju Procleix Panther System z reagenti Procleix Ultrio Elite Assay, Grifols. V primeru reaktivnega rezultata smo določili še virusno breme na analizatorju GeneXpert System z reagenti Cepheid Xpert HBV Viral Load Assay, Cepheid.

Rezultati

Med 36 vzorci krvodajalcev, ki smo jih uspešno ultracentrifugirali, smo pri testiranju NAT z reagenti Procleix Ultrio Elite Assay pridobili en reaktiven rezultat. S kvantitativnim testom smo rezultat potrdili in določili virusno breme, ki je bilo < 10 IE/mL HBV DNA. Z ultracentrifugiranjem

smo tako identificirali eno HBV DNA pozitivno enoto od skupno 36 (2,8%) anti-HBc reaktivnih enot, s prisotnostjo protiteles anti-HBs < 100 IE/L. V enoti nismo dokazali protiteles anti-HBs.

Razprava

Glede na literaturo, kljub občutljivemu presejalnemu testiranju, obstaja tveganje za prenos okužbe HBV s transfuzijo. To smo z raziskavo potrdili tudi sami, saj smo pri anti-HBc reaktivnemu /anti-HBs nereaktivnemu vzorcu po ultracentrifugiranju zaznali HBV DNA. Prenos okužbe na prejemnika transfuzije je odvisen od več različnih dejavnikov. Prisotnost večjega virusnega bremena v transfundirani komponenti, pomeni večje tveganje za prenos. Na primeru iz Slovenije so izračunali, da obstaja možnost prenosa že pri izjemno nizkih koncentracijah (3 IE HBV DNA/mL). Prisotnost zaščitnih protiteles bodisi v komponenti krvi bodisi pri prejemniku zmanjša možnost okužbe. V državah, kjer opravljajo presejalno testiranje vzorcev krvodajalcev na prisotnost protiteles anti-HBc, krvodajalcev, ki imajo istočasno prisotna anti-HBs > 100 IE/L in negativen rezultat NAT večinoma ne odklanjajo. Na Japonskem transfundirajo anti-HBc reaktivne enote krvi, če le-te vsebujejo vsaj 200 IE/L protiteles anti-HBs in v zadnjih 25 letih niso imeli zabeleženega prenosa okužbe. Pomemben je tudi volumen transfundirane komponente krvi in vrsta komponente. V plazmi je količina virusnega bremena večja kot pri enotah trombocitov ali eritrocitov. Imunski status bolnika ima prav tako pomemben vpliv pri dovzetnosti za okužbo s transfundirano komponento krvi. Pri imunsko oslabljenih osebah je verjetnost prenosa okužbe večja.

Določen odstotek anti-HBc reaktivnih vzorcev je verjetno posledica slabše specifičnosti samega testa. Ponekod za potrditev reaktivnega rezultata anti-HBc oz. razločevanje med pozitivnim in lažno reaktivnim rezultatom uporabljajo en ali več dodatnih testov anti-HBc, saj visoko specifičnega potrditvenega testa ni na tržišču.

Ker z anti-HBc lahko le posredno dokazujemo možnost OBI in ker obstajajo tudi seronegativni posamezniki z OBI, je potreba po razvoju občutljivejših testov za zaznavanja HBV DNA pri presejalnem testiranju krvodajalcev upravičena.

Zaključek

Kljub negativnemu presejalnemu testiranju obstaja pri OBI tveganje za prenos okužbe s transfuzijo. Med skupno 5706 enotami, ki smo jih testirali na prisotnost protiteles anti-HBc, smo po ultracentrifugiranju prisotnost HBV DNA potrdili pri enem anti-HBc reaktivnem vzorcu. Ker v tej enoti ni bilo prisotnih nevtralizacijskih protiteles anti-HBs, bi lahko transfuzija take enote oz. posameznih komponent krvi vodila v prenos HBV.

Literatura

1. Candotti D, Assennato SM, Laperche S, Allain JP, Levicnik-Stežinar S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose. *Gut* 2019;68(2):313-321.
2. Raimondo G, Locarnini S, Pollicino T, Levrero M, Zoulim F, Lok AS, et.al. Update on the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2019;71:397-408.
3. Deng X, Guo X, Li T, Laperche S, Zang L, Candotti D. Alternative hepatitis B virus DNA confirmatory algorithm identified occult hepatitis B virus infection in Chinese blood donors with non-discriminatory nucleic acid testing. *Blood Transfus.* 2022;20(1): 8-17.
4. Zbinden A, Ries J, Redli PM, Shah C, Glauser A, Gosling D et al. Prevalence of occult hepatitis B virus infection in blood donors with negative ID-NAT in Switzerland. *Transfus Med Hemother* 2022;49:338-344.

Prevalenca in incidenca okužbe z virusom hepatitisa E (HEV) med krvodajalci v Sloveniji

Polona Nograšek , Tina Koren, Anamarija Tomić, Klara Železnik

UVOD: Transfuzijske ustanove v Republiki Sloveniji so zadolžene za preskrbo prebivalstva države s krvjo in krvnimi pripravki. V vsaki odvzeti enoti krvi, namenjeni za pripravo in uporabo, je opravljeno z zakonom predpisano presejalno testiranje na označevalce okužb, ki se prenašajo s krvjo.

Hepatitis E je infektivna bolezen, ki jo povzroča virus hepatitisa E (HEV). Znanih je 8 genotipov, od katerih sta na področju Evrope prisotna predvsem genotipa 3 in 4, ki povzročata zoonozo, ki se prenaša predvsem s toplotno slabo obdelano svinjino. Pri zdravih posameznikih akutna okužba z genotipoma 3 in 4 v 95% poteka asimptomatsko (EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection J Hepatol 2018). Če pa se okužijo bolniki z oslabiljenim imunskim odzivom (po transplantaciji, bolniki z limfomom/levkemijo, HIV okužbo), pa se okužba lahko razvije v kronični hepatitis E. Pri prejemnikih organov naj bi po ocenah akutni hepatitis E v več kot 60% primerov napredoval v kronično okužbo, ki povzroča poškodbo jeter, napreduje v cirozo in lahko tudi v smrt (KamarN et al. N Engl J Med. 2008).

Krvodajalci se s HEV okužijo s kontaminirano hrano, posledično pa so bolniki izpostavljeni kontaminiranim krvnim pripravkom. Nekaj prenosov je že bilo dokazanih z molekularno potrjeno identiteto virusa v dajalcu in prejemniku (Cheung CKM World J Gastroenterol. 2022)

Okužba s HEV je lahko prenosljiva s transfuzijo krvnih komponent v kratki fazi viremije. V posameznih državah EU že poteka testiranje krvodajalcev na HEV RNA, v nekaterih drugih pa izvajajo oz. so izvedli prevalenčne študije za oceno tveganja prenosa HEV s transfuzijo krvi (Boland et al. 2019). Da bi ugotovili, kolikšno je tveganje za tovrsten prenos okužbe na prejemnika krvi v Sloveniji, smo izvedli epidemiološko raziskavo o prekuženosti in morebitnih svežih okužbah v populaciji slovenskih krvodajalcev.

Najprej smo izvedli rutinsko testiranje na z zakonom predpisane označevalce okužb (HBV DNA, HCV RNA in HIV 1,2 RNA). V preostanku vzorcev za presejalno testiranje krvodajalcev, ki jih sicer po uporabi zavržemo, smo izvedli testiranje NAT (določitev prisotnost HEV RNA) in/ali serološko testiranje (določitev protiteles anti-HEV). Pri preiskovancih, ki so imeli reaktiven rezultat na protitelesa IgG anti-HEV in bodo imeli reaktiven rezultat tudi na IgM anti-HEV in negativen rezultat testiranja HEV NAT bomo izvedli določanje avidnosti protiteles IgG in na ta način ugotavljali, ali gre za akutno okužbo. Protitelesa IgM anti-HEV namreč niso zanesljiv pokazatelj akutne okužbe, saj lahko perzistirajo še več mesecev po izzveneli okužbi (Riveiro-Barciela et al. 2020).

Testiranje NAT smo izvajali na vsaki posamezni enoti krvi (angl. individual donation, ID) z novim CE certificiranim testom, ki hkrati določa prisotnost HEV RNA, HBV DNA, HCV RNA in HIV 1,2 RNA. Poleg določanja prevalence akutnih okužb s HEV med krvodajalci, vzporedno na podlagi primerjave rezultatov rutinskega testiranja izvajamo tudi verifikacijo novega testa, kar nam omogoča takojšnji prehod na nov reagent v primeru spremembe zakonodaje v smislu obveznega testiranja krvodajalcev še dodatno na HEV RNA.

Preiskovanci so testirani anonimno, pod identifikacijsko kodo odvzema krvi. Število vključenih vzorcev krvodajalcev iz posamezne regije je primerljivo z dejansko porazdelitvijo prebivalcev po statističnih regijah v državi. O izvidih testiranj krvodajalce obveščamo le v primeru, da bomo pri njih zaznali akutno okužbo s HEV (prisotnost HEV RNA). Enot krvi, pri katerih zaznamo vsebnost HEV RNA, ne uporabimo za transfuzijo. Prijavo HEV RNA pozitivnih krvodajalcev v skladu z Zakonom o nalezljivih boleznih sporočamo na Območno enoto NIJZ. Rezultate bomo statistično obdelali in objavili v strokovni literaturi.

METODE: za testiranje NAT na HEV RNA smo uporabili nov reagent Procleix UltrioPlex E (Proizvajalec: Diagnostic Grifols, S.A, Španija), ki temelji na metodi TMA (angl. Transcription Mediated Amplification). Pretestirali bomo okvirno 9000 vzorcev krvi dajalcev.

Serološke rezultate na prisotnost protiteles IgG in IgM anti-HEV in avidnost protiteles IgG bomo pridobili z metodo ELISA, in sicer z reagenti HEV IgG – ELISA in HEV IgM – ELISA proizvajalca Dia.Pro Diagnostic Bioprobes Srl, Italija.

REZULTATI NAT TESTIRANJA: do 2.4.2024 smo pretestirali 7724 vzorcev krvi dajalcev, od tega smo pri 2 dokazali HEV RNA (1:3862 oz. 0,026%).

REZULTATI SEROLOŠKEGA TESTIRANJA: do 2.4.2024 smo pretestirali 599 vzorcev krvi dajalcev, predhodno testiranih na HEV RNA, od tega smo pri 43 dokazali anti-HEV IgG protitelesa (prekuženost: 7,18%). Pri anti-HEV IgG pozitivnih bomo izvedli tudi testiranje na anti-HEV IgM protitelesa.

ZAKLJUČKI: Študijo smo začeli izvajati v januarju 2024. Do 2.4.2024 smo dokazali 0,026% incidenco in 7,18% prevalenco. Dosedanji podatki so primerljivi s podobno študijo, ki smo jo izvedli v letu 2019. Sledi še dokončanje eksperimentalnega dela, sortiranja podatkov, statistična obdelava rezultatov in analiza v okviru magistrske naloge ter objava izsledkov v strokovni reviji. Presejalno testiranje krvodajalcev na HEV RNA se bo uvedlo v primeru, če bodo to zahtevale strokovne smernice, s študijo pa smo pripravili podlago in možnost za takojšnjo uvedbo presejalnega testiranja, če bo tako odločeno. Treba bo le določiti pristop (selektivno ali univerzalno testiranje, testiranje posameznih vzorcev ali poolov) ter ovrednotiti stroške in njihov vpliv na ceno krvi.

Kontrole kakovosti pri testiranju krvodajalcev na označevalce okužb prenosljivih s krvjo

Martina Gajšek Grbec, Katja Jazbec Čepin

Transfuzijski Center, Splošna bolnišnica Celje

martina.gajsek-grbec@sb-celje.si

Uvod

Učinkovito in zanesljivo presejalno testiranje krvodajalcev na označevalce okužb, ki se prenašajo s krvjo, je eno izmed ključnih pristopov pri zagotavljanju varne krvi za transfuzijo. Cilj je pravočasno pridobiti točne rezultate za testirane označevalce okužb prenosljivih s krvjo, da preprečimo morebiten prenos okužbe na prejemnika. Kakovost presejalnega testiranja zajema tako splošne kot specifične pristope. Postopki zagotavljanja kakovosti presejalnega testiranja zajemajo: izbor primernih, v skladu z Uredbo o in-vitro diagnostičnih pripomočkih (EU) 2017/746 licenciranih testov namenjenih za presejanje, usposabljanje in izobraževanje osebja, oceno kompetentnosti, vzdrževanje in kalibracijo aparaturne opreme ter monitoring pogojev hranjenja reagentov in materialov. Presejalni testi morajo imeti optimalno občutljivost, da zaznajo okužbo pri krvodajalcu in dovolj visoko specifičnost, da je izguba darovanih enot zaradi nespecifičnih reaktivnosti pri presejalnem testiranju čim manjša.

Namen

Namen prispevka je predstaviti izvajanje kontrol kakovosti na področju serološkega presejalnega testiranja označevalcev okužb prenosljivih s krvjo. Kontrole kakovosti obsegajo izvajanje internih kontrol in vključenost v zunanjo shemo kakovosti.

Materiali in metode

Pregledali smo literaturo in priporočila Sveta Evrope. Analizirali smo primere odstopanj vrednosti run kontrole pri serološkem presejalnem testiranju krvodajalcev na okužbe, ki se prenašajo s krvjo

v Transfuzijskem Centru Celje. Prikazali bomo nekaj primerov odstopanj vrednosti kontrol na kontrolnih kartah, ki jih uporabljamo s pomočjo portala EDC-Net.

Rezultati

Standardi Sveta Evrope določajo, da mora laboratorij pri presejalnem testiranju zagotavljati vsaj zahteve kakovosti proizvajalca analizatorja in testov. Proces serološkega presejalnega testiranja mora biti validiran s strani laboratorija, ki testiranje izvaja. Pred uporabo novega lota reagenta izvedemo vhodno kontrolo. Interne dnevne kontrole kakovosti reagentov in metode testiranja obsegajo interno kontrolo proizvajalca testa (in-kit kontrolo) in priporočeno šibko pozitivno kontrolo (run kontrolo) neodvisnega proizvajalca. Interne kontrole proizvajalca testov izvedemo pred testiranjem vzorcev za vsak lot reagenta. Rezultate in-kit kontrol reagentov spremljamo s pomočjo Levey-Jenningsovih krivulj, ki jih izriše sam analizator. Z njimi evaluiramo kalibracijo testa. Vrednosti morajo biti znotraj območja navedenega v priloženih navodilih proizvajalca. Meje proizvajalca za ustrezno območje S/CO (Sample/Cutt Off) vrednosti in-kit kontrol zajemajo široko območje in odstopanja vrednosti in-kit kontrol so redka. Po Priporočilih Sveta Evrope in ISO 15189 je za spremljanje kakovosti testiranja vsakodnevno priporočljiva tudi uporaba šibko pozitivne kontrole proizvajalca neodvisnega od proizvajalca testa.

Šibko pozitivna kontrola neodvisnega proizvajalca je namenjena zaznavanju naključnih in sistemskih napak pri testiranju. Za analizo rezultatov šibko pozitivne kontrole uporabljamo internetno platformo EDC-Net, ki nam nudi podporo pri interpretaciji S/CO vrednosti run kontrole in omogoča primerjavo rezultatov z rezultati drugih laboratorijev.

Rezultati obeh kontrol (in-kit kontrole in run kontrole) morajo biti ustrezni za sprostitev rezultatov testne serije. V primeru odstopanja vrednosti in-kit kontrole, moramo kontaktirati serviserja, da odpravi napako, saj nam sistem ne dovoli izvajanja testiranja, če vrednosti in-kit kontrol niso ustrezne.

Šibko pozitivna kontrola neodvisnega proizvajalca mora biti čimbolj stabilna v daljšem časovnem obdobju, da omogoča uporabo z več loti reagenta posameznega testa. Ustreznost S/CO vrednosti

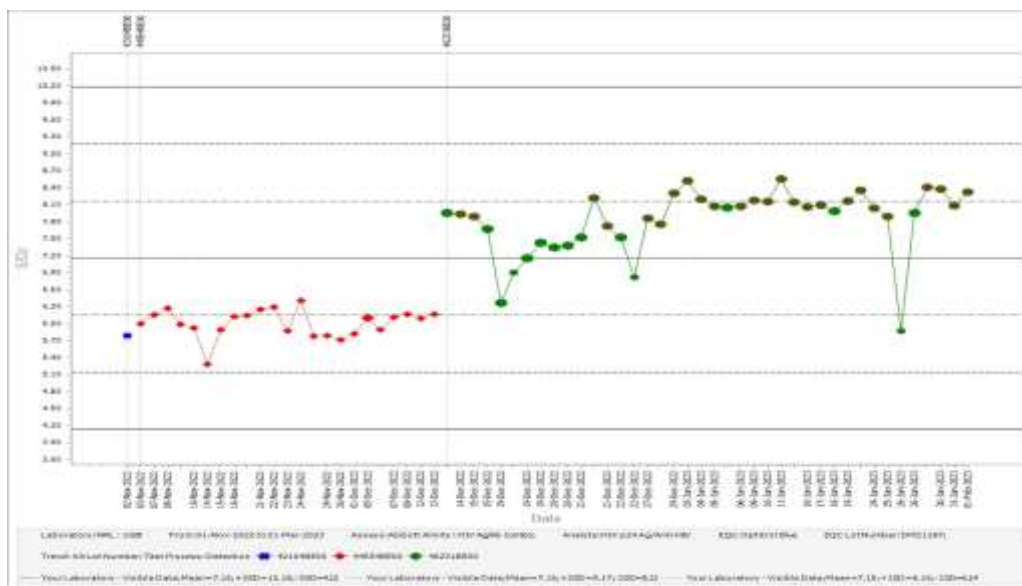
run kontrole ocenjujemo glede na 3 SD vrednosti na našem analizatorju in NRL-limit, ki jih je za posamezni lot run kontrole določil proizvajalec kontrole. V primeru odstopanja run kontrole preverimo ustreznost vzorca kontrole, ustreznost reagentov in stanje analizatorja. Kontrolo ponovno testiramo in preverimo, če je potrebna rekaliibracija reagenta. V primeru, da težav ne moremo odpraviti, se posvetujemo s proizvajalci run kontrole in sledimo njihovim navodilom. V prispevku bomo prikazali primer zamika S/CO vrednosti run kontrole zaradi menjave lota reagenta znotraj sprejemljivih vrednosti in zamik vrednosti izven območja, ki jih je določil proizvajalec kontrole ter upadanje S/CO vrednosti kontrole zaradi bližanja roku zapadlosti.

V Transfuzijskem Centru Splošne bolnišnice Celje uporabljamo run kontrolo Optitrol Blue proizvajalca Diamex/NRL za štiri označevalce okužb (Anti-HIV 1/HIV2+P24Ag, Anti-HCV, HBsAg in Anti-TP) na analizatorju Alinity i in internetno platformo EDC-Net. Run kontrolo testiramo ob koncu testne serije vzorcev. Najpogostejši vzrok odstopanja S/CO vrednosti run kontrole je menjava lota reagenta. Na kontrolni karti (Levey- Jenningsova krivulja) vidimo zamik S/CO vrednosti navzgor ali navzdol od S/CO vrednosti prejšnjega lota reagenta. Najpogosteje so vrednosti S/CO znotraj 3 SD vrednosti run kontrole v našem laboratoriju in znotraj območja vrednosti NRL-limit, ki jih je na podlagi velikega števila meritev določil proizvajalec run kontrole. V tem primeru lahko smatramo vrednosti run kontrole za sprejemljive.

V primeru zamika S/CO vrednosti run kontrole Optitrol Blue DM21187 s testom Abbott Alinity i HIV Ag/Ab Combo, lot 46231BE00 navzgor na Sliki 1 prikazujemo odstopanje S/CO vrednosti run kontrole izven zgornje meje proizvajalca (t.i. NRL-limit). Vrednosti in-kit kontrol proizvajalca so bile ustrezne, prav tako nismo opazili odstopanj v S/CO vrednosti vzorcev krvodajalcev. Podobne vrednosti so imeli v času testiranja še v treh laboratorijih. Kontaktirali smo proizvajalca run kontrole, ki nam je podal informacijo, da opazujejo zamik vrednosti run kontrole z več loti Abbott Alinity i HIV Ag/AB Combo testa in da proizvajalec testa Abbott poskuša odpraviti zamik z naslednjimi loti. Proizvajalec run kontrole je predlagal, da opazujemo gibanje vrednosti run kontrole glede na SD naših meritev in SD drugih laboratorijev, ki uporabljalo iste lote reagentov. Vse vrednosti Optitrol Blue z lotom Abbott Alinity i HIV Ag/Ab Combo 46231BE00 so bile znotraj naših 3 SD. V skladu z informacijo smo v naslednjih mesecih opazili višje vrednosti S/CO run

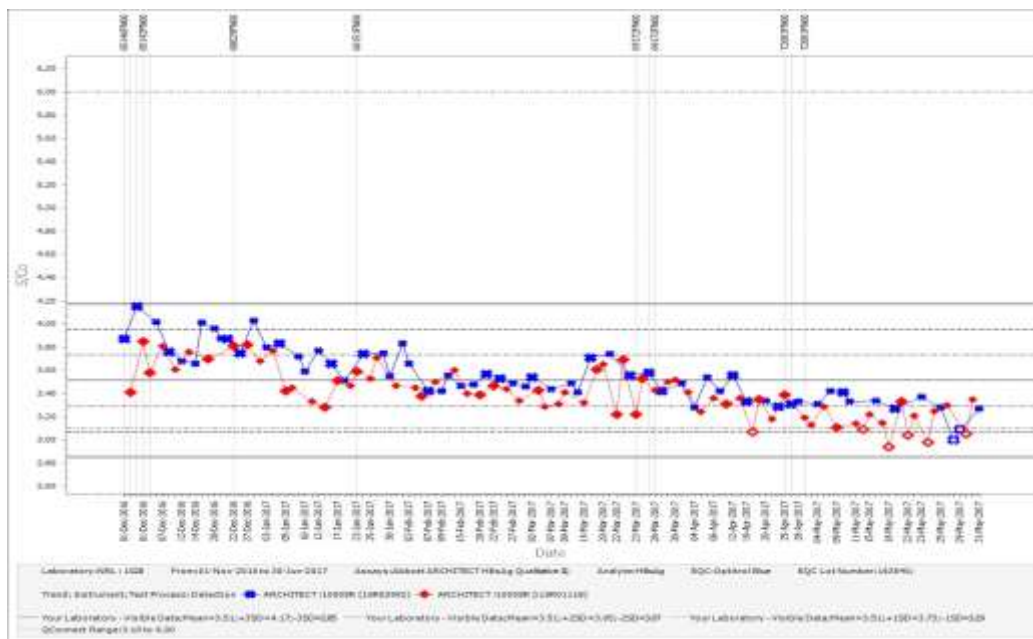
kontrolne Optitrol Blue še s petimi loti Abbott Alinity i HIV Ag/AB Combo testa, vendar s temi naslednjimi loti vrednosti S/CO niso bile izven območja NRL-limit.

Slika 1: Zamik S/CO vrednosti run kontrole Optitrol Blue z testom Abbott Alinity i HIV Ag/Ab Combo, lot 46231BE00



Na sliki 2 prikazujemo zamik S/CO vrednosti run kontrole Q Connect Blue, lot 163640 s testom Abbott ARCHITECT HBsAg Qualitative II. Posamezne vrednosti run kontrole so bile izven spodnje meje NRL-limit. Testiranje kontrole smo ponovili in dobili ustrezno vrednost S/CO. Izpad kontrole je bil vedno pogostejši kljub recalibraciji testa, prav tako so bile naše vrednosti S/CO run kontrole nižje kot v drugih laboratorijih. Na grafu, ki zajema daljše časovno obdobje (Slika 2) prikazujemo nižanje S/CO vrednosti run kontrole tik pred rokom zapadlosti run kontrole Q Connect Blue.

Slika 2: Upadanje vrednosti run kontrole zaradi bližanja roku zapadlosti kontrole



Zaključek

Dnevne kontrole reagentov nam omogočajo dnevni nadzor nad kakovostjo presejalnega testiranja krvodajalcev na označevalce okužb prenosljivih s krvjo. Vrednosti interpretiramo v skladu z navodili proizvajalca testov in kontrol ter v primeru odstopanja ustrezno ukrepamo. Uporaba kontrolnih kart nam omogoča primerjavo rezultatov run kontrol z rezultati drugih laboratorijev, razumevanje variabilnosti run kontrole in razločevanje med sprejemljivimi in kritičnimi odstopanji S/CO vrednosti kontrol. Spremljanje kontrol nam omogoča pravočasno zaznavanje posameznih in sistemskih odstopanj pri testiranju ter ustrezno ukrepanje.

Literatura

1. Screening for markers of transfusion-transmissible infection. In: Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, Recommendation No.(96) 15, 21st Edition, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) Council of Europe, 2023

2. Dimech WJ, Vincini A, Plebani M, Lippi G, Nichols JH, Sonntag O. Time to address quality control processes applied to antibody testing for infectious diseases. *Clin Chem Lab Med* 2023; 61(2):205-212

Izzivi dela na dislociranih enotah (ZTMS)

Oskrba hematoloških bolnikov enodnevne bolnišnice SB NM s komponentami krvi

Anja Zore Jerina

Center za transfuzijsko dejavnost Novo mesto

anja.zore-jerina@ztm.si

Uvod

Internistična enodnevna bolnišnica (IEB) Splošne bolnišnice Novo mesto je specializirana za obravnavo pacientov, ki ne zahtevajo hospitalizacije, ampak le terapijo z zdravili ali komponentami krvi. Med njihovimi pacienti so tudi bolniki z različnimi boleznimi krvi, kot so mielodisplastični sindrom, kronična limfocitna levkemija, diseminirani plazmocitom, akutna mieloblastna anemija, mielofibroza, trombocitopenija in podobno. Takšni pacienti lahko občasno ali redno potrebujejo transfuzije komponent krvi- pogosto koncentrirane eritrocite z odstranjenimi levkociti (KEF) ali koncentrirane trombocite (KT). Posebnost obravnave pacientov v IEB je, da po prejemu terapije isti dan odidejo domov, saj se delo v tej enoti načeloma zaključi ob 15. uri. To postavlja izzive predvsem glede oskrbe s krvnimi komponentami, še posebej za tiste, ki potrebujejo posebne enote krvi, kot so antigensko skladne enote ali enote z dodatno obdelavo- npr. obsevane komponente.

Center za transfuzijsko dejavnost Novo mesto in sodelovanje z internistično enodnevno bolnišnico

Na Centru za transfuzijsko dejavnost Novo mesto (CTD NM), ki oskrbuje tudi paciente IEB, imamo stalno na zalogi določeno količino enot koncentriranih eritrocitov in enot sveže zmrznjene plazme, medtem ko enote trombocitov dobavljamo izključno po prejetem naročilu. Če primernih enot eritrocitov na CTD NM ni na zalogi, se morajo ciljano naročiti na Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani (ZTM LJ). Redne transportne povezave potekajo ob ponedeljkih, torkih in četrtek, vendar se v primeru nujnosti poslužujemo tudi izrednih transportov.

Pomemben dejavnik, ki vpliva na pravočasno oskrbo pacientov IEB s komponentami krvi, je čas, potreben za dobavo posebnih enot eritrocitov iz Ljubljane v Novo mesto, in čas za izvedbo predtransfuzijskega testiranja, ki mora biti pred izdajo enot opravljeno. Če bi za paciente, ki potrebujejo npr. razširjeno antigensko skladne enote ali obsevane komponente iz ZTM LJ dobavljali šele po prejemu naročila, ki jih običajno prejmemo dopoldne, večina bolnikov transfuzije ne bi mogla prejeti v sklopu IEB zaradi omejenega delovnega časa. Pomembno je, da pri pozitivnih navzkrižnih preizkusih, komponente krvi transfundirajo počasi in paciente dodatno opazujejo.

Uvedli smo sistem predhodnega sporočanja, kar je pripomoglo k hitrejši oskrbi pacientov IEB, ki potrebujejo posebne komponente krvi, ki jih običajno na CTD NM nimamo na zalogi. Ta sistem omogoča boljše načrtovanje in usklajevanje med različnimi institucijami, kar izboljšuje celoten proces oskrbe pacientov s krvjo. Čeprav ta sistem zahteva več dela na obeh straneh, pa prispeva k izboljšanju kakovosti oskrbe pacientov in s tem povečuje zadovoljstvo pacientov.

Dvakrat tedensko (po potrebi tudi večkrat) vzpostavljamo telefonski stik z IEB, da pridobimo informacije o pacientih, ki so naročeni v IEB in za katere se predvideva, da bodo potrebovali transfuzijo komponent krvi. V ponedeljek preverimo, katere paciente, ki običajno potrebujejo transfuzijo, pričakujemo v torek, sredo in četrtek, medtem ko v četrtek zjutraj preverimo stanje za petek in naslednji ponedeljek. Izkušnje medicinskih sester v IEB in njihovo poznavanje pacientov so pri tem neprecenljive. Glede na pridobljene matične podatke pacientov (priimek, ime, rojstni datum) v našem informacijskem sistemu preverimo ali pacient potrebuje posebne komponente (antigensko skladne/obsevane) in to zabeležimo na obrazec »Seznam pacientov naročenih v enodnevno bolnišnico«. Če pacient potrebuje antigensko skladne enote, bodisi zaradi prisotnosti alo-protiteles, avto-protiteles ali terapije z daratumumabom, najprej preverimo, ali so ustrezne enote že med našo obstoječo zalogo. Če primerne enote najdemo na CTD NM, jih za določenega pacienta rezerviramo (označimo s priimkom, imenom in rojstnim datumom). V primeru, da primernih enot ne najdemo med obstoječo zalogo na CTD NM, jih moramo ciljano naročiti na ZTM LJ, vsaj dan pred predvideno kontrolo pacientov v IEB. Tudi informacijo o stanju

komponent (ali smo primerno enoto našli in rezervirali na CTD NM, ali jo je potrebno ciljano naročiti) zabeležimo na naš obrazec.

Primer izpolnjenega obrazca:

SEZNAM PACIENTOV NAROČENIH V ENODNEVNO BOLNIŠNICO				
DAN, DATUM	IME IN PRIIMEK, BOL.DATUM	K2 v IZ Datum	OPOMBE	STATUS KOMPONENT (previdno naročiti, rezervirano v študijski =)
9.3.2022		OPRA	+	✓
		OPRA	+	✓
10.3.2022				
11.3.2022		OPRA	+	✓
12.3.2022		OPRA	+	✓
13.3.2022		OPRA	+	✓
14.3.2022		OPRA	+	✓
15.3.2022		OPRA	+	✓
16.3.2022		OPRA	+	✓
17.3.2022		OPRA	+	✓
18.3.2022		OPRA	+	✓
19.3.2022		OPRA	+	✓
20.3.2022		OPRA	+	✓
21.3.2022		OPRA	+	✓
22.3.2022		OPRA	+	✓
23.3.2022		OPRA	+	✓
24.3.2022		OPRA	+	✓
25.3.2022		OPRA	+	✓
26.3.2022		OPRA	+	✓
27.3.2022		OPRA	+	✓
28.3.2022		OPRA	+	✓
29.3.2022		OPRA	+	✓
30.3.2022		OPRA	+	✓
31.3.2022		OPRA	+	✓

Vir: Arhiv, CTD Novo mesto

S takšnim načinom dela lahko tako na dan, ko so pacienti naročeni na kontrolo v IEB, zagotovimo prisotnost vsaj ene ali dveh enot primernih za paciente, ki potrebujejo posebne komponente. V primeru, da izvidi in klinična slika kažejo na potrebo po transfuziji, jih lahko takoj pripravimo. Pacienti morajo počakati samo toliko časa, da se izvede ustrezno predtransfuzijsko testiranje. Transfuzijo potrebnih enot prejmejo v istem dnevu, kot so prišli na pregled, kar je za paciente pomembno, saj bi bila v nasprotnem primeru potrebna hospitalizacija ali ponovni obisk naslednji dan.

Nekaj naših primerov pacientov IEB, ki so potrebovali posebne enote, ki jih običajno ne najdemo med že obstoječo zalogo na CTD NM:

- Pacientka z multiplimi protitelesi B.S. za katero smo v izogib dodatni senzibilizaciji zagotavljali še dodatno razširjeno antigensko skladne enote tudi v antigenih proti katerimi še ni stvorila protiteles (c-E-Cw-K-S-). Frekvenca za njo primernih enot je bila 2 od 100 RhD-pozitivnih enot. Pacientkina krvna skupina je bila A, RhD-pozitivna. Za njo smo iskali ustrezne enote med A, RhD-pozitivnimi in 0, RhD pozitivnimi enotami, kar pomeni, da smo glede na naše predvidene zaloge, primerne enote lahko iskali med cca. 45 enotami.
- Pacient z avto-protitelesi K.J. Avto-protitelesa so protitelesa, ki so usmerjena proti lastnim celicam, ki lahko zakrijejo prisotnost klinično pomembnih alo-protiteles, zato pacient potrebuje razširjeno antigensko skladne enote (čim bolj podobne njegovim lastnim eritrocitom). V našem primeru je imel pacient poleg avto-protiteles prisotna tudi alo-protitelesa specifičnosti anti-Jka, potreboval je Jk(a-)C-Cw-E-K-S- enote. Za njega so bile primerne 3 od 100 RhD-negativnih enot, ki smo jih iskali med A, RhD-negativnimi enotami in 0, RhD-negativnimi enotami, kar pomeni med cca. 20 enotami. Navzkrižni preizkusi so pričakovano pozitivni.
- Podobno kot pri pacientih z avto-protitelesi, lahko prisotnost klinično pomembnih protiteles zakrije tudi terapija z daratumumabom (monoklonsko protitelo, ki se veže na beljakovino CD38). Pri pacientih, pri katerih se razmišlja o uvedbi terapije z daratumumabom, je ključna serološka določitev antigenov iz predtransfuzijskega vzorca. V nasprotnem primeru je potrebna genotipizacija antigenov, ki prav tako zahteva svoj čas. Navzkrižni preizkusi so tudi tukaj pričakovani pozitivni. Tudi za takšne bolnike zagotavljamo razširjeno antigensko skladne enote. Za pacientko P.M. se je iskalo c-E-K-Cw-Jk(a-)Fy(a-)S-Kp(a-)Lu(a-), frekvenca takšnih enot je 3 od 1000 med RhD-pozitivnimi enotami. Ker je bila pacientkina krvna skupina A, RhD-pozitivna, smo imeli na voljo cca. 45 enot (vključno z 0, RhD-pozitivnimi enotami).

- V IEB so obravnavali tudi pacientko Ž.V., ki je potrebovala obsevane komponente, ki jih nimamo v običajni zalogi na CTD NM. Obsevanje komponent se opravi na ZTM LJ.

Glede na to, da je nekatere zgoraj navedene enote med našo običajno zalogo skoraj nemogoče najti, se je sistem predčasnega sporočanja za te bolnike izkazal kot zelo dober način pravočasne preskrbe s komponentami.

Kontinuirano prilagajanje procesov in sodelovanje med različnimi institucijami sta ključnega pomena za izboljšanje kakovosti oskrbe pacientov v Internistični enodnevni bolnišnici. S stalnim nadzorom nad zalogo krvnih komponent, učinkovitim komunikacijskim sistemom in prilagodljivostjo pri dostavi enot krvi lahko zagotovimo, da bodo pacienti IEB prejeli potrebne komponente krvi pravočasno in varno.

Zaključek

Vzpostavitev tesnega sodelovanja med IEB in CTD NM je ključnega pomena za uspešno izvajanje sistema predhodnega sporočanja in zagotavljanje pravočasne oskrbe pacientov s krvnimi komponentami. Z vzpostavitvijo učinkovitih komunikacijskih kanalov, rednim izobraževanjem zdravstvenega osebja ter stalnim nadzorom nad krvnimi zalogami lahko zagotovimo, da bo sistem še naprej deloval učinkovito in da bodo pacienti IEB prejeli potrebne komponente krvi v najkrajšem možnem času.

Skupni cilj vseh vpletenih institucij je ustvariti okolje v Internistični enodnevni bolnišnici, ki zagotavlja visoko kakovostno zdravstveno oskrbo pacientom. To okolje ne le omogoča pacientom čim boljše rezultate zdravljenja in izboljšuje njihovo življenjsko kakovost, temveč tudi vzpostavlja občutek varnosti in dobre oskrbe. S stalnim prizadevanjem za izboljšanje procesov ter tesnim sodelovanjem med različnimi institucijami, lahko dosežemo ta cilj. Skozi to usklajeno delovanje ustvarjamo najboljšo možno oskrbo pacientov, ki jim omogoča, da se počutijo podprte in varne v času zdravljenja.

Urgentna izdaja komponent krvi na Centru za transfuzijsko dejavnost Novo mesto

Klara Fabjan

Center za transfuzijsko dejavnost Novo mesto

klara_fabjan@ztm.si

Uvod

Na Center za transfuzijsko dejavnost Novo mesto (v nadaljevanju: CTD NM) skrbimo za preskrbo s komponentami krvi bolnikov Splošne bolnišnice Novo mesto. Naročila ločimo po stopnji nujnosti in sicer: redno, nujno, izjemno nujno (urgenca 9, urgenca 0). Pod redna naročila spadajo tista naročila, pri katerih imamo za predtransfuzijska testiranja časa nekaj ur. Nujna stopnja izdaje pomeni prednostno obravnavo in izvedbo predtransfuzijskega testiranja v roku 60 minut. Izjemno nujna stopnja na urgenco 9, pa predstavlja izdajo 0, RhD negativnih (v nadaljevanju: 0-NEG) KEF (eritrociti, odstranjeni levkociti) ali SZP (sveže zmrznjena plazma) AB krvne skupine, ko gre za življenje ogrožajoče stanje pacienta in nimamo časa za izvedbo predtransfuzijskih preiskav. Tudi v primeru, ko gre za izjemno nujno izdajo SZP, jo moramo na CTD NM pred izdajo odtaliti, saj se hrani v zamrznjenem stanju. Taljenje enot poteka s toplim zrakom v aparatu za taljenje sveže zmrznjene plazme "Sahara" in traja približno 20-30 minut. Izdajo izjemno nujnih naročil lahko izdamo tudi na urgenco 0, kar pa pomeni, da je komponenta izdana takoj, brez opravljenih predtransfuzijskih testiranj, vendar na pacientovo krvno skupino. Upoštevajoč določene strokovne zahteve (naročnik ima izvid KS (krvna skupina) in iz aktualnega vzorca krvi pacienta določitev KS na ploščici ustreza izvidu KS). Transfuzijski informacijski sistem ima pri izdaji komponent krvi na urgenco 0 varovalo, ki preprečuje naključno izdajo enot pri pacientih z znanimi protitelesi iz sistema Rh in Kell.

Posebnosti pri izjemno nujni izdaji krvnih komponent

Pri izdaji izjemno nujnih naročil smo pozorni, da zagotavljamo 0-NEG KEF, ki so po izpisu vsaj C-E. Za nedonošenčke, novorojenčke pediatrične bolnike do 1 leta zagotavljamo do 5 dni staro kri, oziroma čim bolj svežo kri.

V primeru, da ob izjemno nujnem naročilu naročnik predloži potrebne podatke pacienta, vedno preverimo v transfuzijski informacijski sistem ali pacient v njem že obstaja in ali ima komentarje, ki bi lahko vplivali na izbor komponent. Če ugotovimo, da ima pacient opombe, se posvetujemo z dežurnim konzultantom, kakšne enote je potrebno izdati. Vedeti moramo, da 0-NEG KEF niso univerzalne enote in je pri pacientih, ki imajo določena protitelesa, potrebno biti pozoren, kakšne enote KEF, mu tudi v nujnih primerih zagotavljamo. V izjemnih primerih, ko nimamo podatkov o pacientu, lahko krvne komponente izdajamo tudi na oddelek. Po izjemno nujni izdaji, če je možno, čimprej pridobimo vzorec krvi pacienta ter naročilnico, da se lahko čimprej lotimo predtransfuzijskih preiskav tudi za dodatno naročene komponente, saj so zaloge 0-NEG enot na CTD NM zelo omejene.

Omejena zaloga krvnih komponent na dislociranih enotah

Na CTD NM imamo stalno zalogo enot KEF in SZP vseh KS. Trombocite nimamo stalno na zalogi in jih dobavljamo izključno po naročilu naročnikov iz Zavoda za transfuzijsko medicino Ljubljana (ZTM). Zaloge enot KEF obnavljamo večkrat tedensko, z rednimi načrtovanimi transporti in glede na potrebe, tudi izredno ne glede na delavni čas. Na CTD NM imamo običajno 10-12 prostih enot 0-NEG KEF, zato je pomembno, da brez predtransfuzijskih testiranj izdamo zgolj in samo toliko enot, kot je nujno potrebno, saj zaloge 0-NEG KEF hitro skopnijo. Za dobavo dodatnih enot na dislociranih enotah pa je potreben čas (tako za naročilo, sam transport kot tudi sprejem). Da se izognemo nepotrebnim izdajam 0-NEG KEF brez predtransfuzijskih testiranj, vzorec pacienta, ki ga ob naročilu dobimo takoj vzamemo v delo in čim hitreje določimo KS, ki nam omogoča izdajo vsaj v KS skladnih enot na urgenco 0.

Za vse enote, tako tiste izdane kot izjemno nujne in vse ostale, velja, da jih je potrebno, v kolikor niso transfundirane, vrniti na CTD NM v najkrajšem možnem času.

Evidenca izdaje komponent krvi za izjemno nujna naročila

Na naši dislocirani enoti vodimo evidence izjemno nujne izdaje komponent krvi. Vodimo jih ročno, na seznamu "izdaja enot (KEF/SZP) na urgenco 9 ali urgenco 0, zaradi vodenja statistike. V našem primeru pa je ta seznam predstavljal vir, s katerega so pridobili nekaj statističnih podatkov o izdaji na urgenco 9 in urgenco 0, ki jih predstavljamo v nadaljevanju.

Rezultati

Glede na pregledane rezultate je bila povprečna starost pacientov, za katere so bile izdane enote s stopnjo izjemno nujno, 59 let. Med njimi je bilo 18 pacientov moškega spola in 14 ženskega spola. Diagnoze, ki so bile največkrat navedene so: anemija, melena, ruptura vranice, ruptura arterije, krvavitev iz gastrointestinalnega trakta ter hematotoraks. Največ naročil je bilo sprejetih iz urgentnega centra (16), 5 naročil smo prejeli iz centralno operacijskega bloka, po 4 naročila so bila iz porodniškega oddelka in prav tako iz kirurških oddelkov, 3 naročila pa iz oddelkov intenzivne medicine. 54 izdanih enot je bilo KEF, 4 pa SZP. Od vseh izdanih enot smo 25 naročil izdali na pacienta, 5 naročil pa na oddelek. Le dve izdaji smo izvedli na urgenco 0. 21 naročil je bilo izvedenih v času dežurstva, 11 pa v času rednega dela. V povprečju sta bili na enkrat izdani 2 enoti.

V letu 2022 je bila povprečna starost pacientov 58 let. Od tega je bilo 15 moških in 9 žensk. Prav tako kot prejšnje leto je bilo to leto največ navedenih diagnoz, kot so: anemija, krvavitev iz gastrointestinalnega trakta, neznana krvavitev, ruptura vranice, ruptura aorte, poškodba glave, politravma, melena ter fraktura. 19 naročil smo izdali na urgentni center, 3 v centralno operacijski blok, 2 na oddelke intenzivne medicine in po eno naročilo na porodniški oddelek ter interni

oddelek. Izdanih je bilo 37 KEF. 17 izdaj je bilo na pacienta, 5 pa na oddelek. 23 naročil je bilo obdelanih v času dežurstva, 3 pa v času rednega dela. V povprečju sta bili na enkrat izdani 2 enoti.

V letu 2023 je bila povprečna starost omenjenih pacientov 62 let, od tega je bilo 17 moškega spola in 7 ženskega spola. Najpogosteje omenjene diagnoze so bile: melena, anemija, rupture aorte, rupture vranice ter krvavitev. 14 naročil je bilo naročenih iz urgentnega centra, po 3 naročila so bila sprejeta iz centralno operacijskega bloka ter internega oddelka in oddelka intenzivna medicine, 2 na kirurške oddelke, 1 naročilo je bilo sprejeto iz porodniškega oddelka. 53 enot je bilo KEF, 4 izdane enote pa so bile SZP. 23 naročil je bilo izdanih na pacienta, 3 naročila na oddelek, 2 naročila pa so bila izvedena na urgenco 0. V dežurstvu je bilo izvedenih 19 naročil, 7 pa v času rednega dela. Povprečno smo na enkrat izdali po 2 enoti.

Tabela 2: Izjemno nujna izdaja krvnih komponent - statistika

LETO/ KATEGORIJE	POVPREČNA STAROST	SPOL	DIAGNOZE	ODDELEK
2021	59 let	14 ženske 18 moški	anemija, melena, ruptura vranice, ruptura arterije, krvavitev iz git, hematoraks	16 – urgentni center 4 – porodniški oddelek 5 – COB 3 – oddelki intenzivne medicine 4 – kirurški oddelki
2022	58 let	9 ženske 15 moški	anemija, krvavitev iz git, neznana krvavitev, ruptura vranice, ruptura aorte, poškodba glave, politratuma, melena, fraktura	19 – urgentni center 1 – internistični oddelek 3 – COB 2 – oddelki intenzivne medicine 1 – porodniški oddelek
2023	62 let	7 ženske 17 moški	melena, anemija, ruptura aorte, ruptura vranice, krvavitev	14 – urgentni center, 2 – kirurški oddelek 3 – COB 3 – oddelki intenzivne medicine 1 – porodniški oddelek 3 – internistični oddelki

Tabela 3: Izjemno nujna izdaja krvnih komponent - statistika

LETO/ KATEG ORIJA	VRSTA ENOT	VRAČILO ENOT	URGENCA 9, NA PACIENTA	URGENCA 9, NA ODDELEK	IZDAJA NA URGENCO 0	ČAS DEŽURSTVA/ REDNEGA DELA	POVPREČNO ŠTEVILO IZDANIH ENOT NA ENKRAT
2021	KEF: 54 SZP: 4	4xKEF	25x	5x	2x	D – 21x R – 11x	2
2022	KEF: 37 SZP: 0	4xKEF	17x	9x	0	D – 23x R – 3x	2
2023	KEF: 53 SZP: 4	4xKEF	23x	3x	2x	D – 19x R – 7x	2

Zaključek:

Izjemno nujna izdaja je zelo pomembna pri pacientih, ki so življenjsko ogroženi in se transfuzija ne more odložiti za čas izvedbe predtransfuzijskega testiranja. Ker je količina 0-NEG enot KEF omejena in se pogosto srečujemo z nizkimi zalogami, le teh na nivoju celotnega ZTM, si bomo tudi v prihodnje prizadevali, da bomo v primerih, ko so izpolnjeni kriteriji, izdali komponente na urgenco 0. V prvi četrtini leta 2024 smo na urgenco 0 izdali že 4 enote. S tem bi lahko zmanjšali porabo 0-NEG komponent KEF, katerih zaloge niso neomejene. Prednost tega, da se nahajamo v prostorih Splošne bolnišnice Novo mesto je ta, da smo naročniku blizu, kar zmanjša čas transporta in omogoča, da lahko čimprej izvedemo predtransfuzijska testiranja.

Literatura:

1. Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. 2024. Stopnje nujnosti naročanja. Pridobljeno s <http://www.ztm.si/krvni-pripravki/komponente-krvi/stopnje-nujnosti-narocanja/>
2. Rožman P, Domanović D, ur. ABC transfuzijske medicine. Ljubljana: Narodna in univerzitetna knjižnica; 2015. p. 12-16.

Organizacija dela v obliki neenakomerno razporejenega delovnega časa na CTD-jih

Mojca Šimc

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

mojca.simc@ztm.si

V sklopu Zavoda RS za transfuzijsko medicino deluje 6 dislociranih enot imenovanih Centri za transfuzijsko dejavnost (CTD), ki so združeni v Oddelek centrov za transfuzijsko dejavnost (OCTD). Zaposleni na CTD-jih, poleg dela s krvodajalci in bolniki, izvajanja osnovnega predtransfuzijskega in prenatalnega testiranja ter preskrbe bolnikov s varnimi in kakovostnimi komponentami krvi v rednem delovnem času, izvajajo tudi neprekinjeno zdravstveno varstvo (NZV) in tako omogočajo nemoteno zdravljenje bolnikov v teh regionalnih bolnišnicah. Skrb za kakovostno, varno in pravočasno preskrbo bolnikov regionalnih bolnišnic s komponentami krvi, tako v dopoldanskem času kot času izvajanja NZV, je torej naše glavno vodilo.

Zaradi rednega 40-urnega delovnika in dodatnega zagotavljanja NZV, zakonskim omejitvam o nadurnem delu, pogosto ni bilo mogoče zadostiti, saj je organizacija dela za zdravstvene delavce na CTD-jih, potekala tako, da so zaposleni (diplomirane medicinske sestre in laboratorijski inženirji) poleg polne delovne obveznosti (8 ur/dan), dodatno skrbeli tudi za zagotavljanje NZV, ko je na CTD prisoten samo eden zaposleni, ki izvaja tako testiranja v laboratoriju, kot skrbi za pripravo in izdajo komponent krvi.

Po Zakonu o delovnih razmerjih lahko nadurno delo traja največ osem ur na teden, največ 20 ur na mesec in največ 170 ur na leto. Nadurno delo lahko s soglasjem delavca traja tudi preko letne časovne omejitve iz prejšnjega odstavka, vendar skupaj največ 230 ur na leto.

Zakon o zdravstveni dejavnosti prav tako omejuje delo preko polnega delovnega časa na v povprečju osem ur tedensko. V primeru pisnega soglasja zdravstvenega delavca in zdravstvenega sodelavca lahko delo preko polnega delovnega časa presega omejitve iz tega člena. Zdravstveni

delavec in zdravstveni sodelavec ima pravico do dnevnega počitka v trajanju nepretrgoma najmanj 12 ur in do tedenskega počitka v trajanju nepretrgoma najmanj 24 ur.

Leta 2021 je predvsem z namenom zmanjšanja števila nadur prišlo do spremembe organizacije dela zaposlenih na CTD-jih, delo se od takrat organizira v obliki neenakomerno razporejenega delovnega časa (NEE).

Glavna sprememba pri organizaciji dela v obliki NEE je, da zaposleni med tednom niso prisotni vedno 8 ur/dan, ampak so lahko prisotni tudi krajši delovni čas, npr. samo 6 ali 7 ur, včasih so tudi nerazporejeni (prosti). Več zaposlenih je na CTD takrat, ko je potreba večja (odvzemni dnevi za krvodajalce, odvzemni čas, več naročil...). Zagotavljanje NZV ni nujno v obliki 24 urne prisotnosti, ampak tudi v obliki 12 ali 16 urne prisotnosti.

40 urni delovnik + 2 dežurstvi																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	Št.	
PON																										NU: 34
TOR																										
SRE																										
ČET																										
PET																										
SOB																										
NED																										
Neenakomerno razporejen delovni čas																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	Št.	
PON																										NU: 14
TOR																										
SRE																										
ČET																										
PET																										
SOB																										
NED																										

Slika 1: Primerjava prisotnosti zaposlenega glede na vrsto organizacije dela

Zaradi različnega obsega dela na CTD-jih, je potreba po zaposlenih na določen dan v tednu na različnih CTD-jih lahko zelo različna. Največ zaposlenih mora biti na CTD-ju prisotnih na odzemni dan, za čas izvajanja krvodajalskih akcij. CTD-ji se med seboj močno razlikujemo tako po številu sprejetih krvodajalcev in kot tudi po številu odzemnih dni. Na potrebo po prisotnosti zaposlenih vplivajo tudi bolniki in število opravljenih terapevtskih odvzemov pri njih ter število preiskav v imunohematološkem laboratoriju, ki so odvisne od naročnikov, ki jih posamezni CTD pokriva ter vrste bolnikov.

Priloga mesečnega rasporeda je s spremembo organizacije dela postala veliko bolj kompleksna. Osnova priprave rasporeda pa je dobro definirana potreba po prisotnosti zaposlenih.

PON (ODV)	TOR (ODV)	SRE (TO)	ČET (ODV)	PET	SRE (ni TO)	LEGENDA 8* novozaposlena, usposabljanje
24	24	24	24	24	24	
8	8	8	8	8	8	
8	8	8	8	8	8	
7	7	7	7	6	7	
7	7	6	7	8*	6	
6	6	6	6		8*	
6	6	8*	6			
8*	8*		8*			

Slika 2: Primer tedenskega rasporeda zaposlenih na CTD NM

Prednost organizacije dela v obliki NEE je z vidika vodstva zagotovo zmanjšanje št. nadur. Po pripravi mesečnega rasporeda, upoštevajoč potrebe po zaposlenih na določen dan, se število predvidenih NU izračuna kot presežek predvideno opravljenih ur glede na mesečno delovno obveznost, ki je predvidena za 40-urni delavnik.

Pred uvedbo organizacije v obliki NEE se je v okviru celotnega OCTD (6 CTD-jev), glede na podatke iz leta 2017 do 2019, mesečno opravilo povprečno 2000 NU. Po uvedbi spremenjene organizacije dela v obliki NEE, pa se je mesečno število NU v okviru celotnega OCTD zmanjšalo na 1300, kar na letni ravni pomeni od 8500 do 9000 NU, kar zagotovo ni zanemarljivo.

Ker so zaposleni med tednom tudi nerazporejeni, se omogočen dodatni počitek, zato so v dnevih, ko so v službi, bolj spočiti in motivirani, kar je z vidika delodajalca in delavca zagotovo dobrodošlo.

Če obstajajo prednosti, pa so na drugi strani tudi slabosti. Ob manjši kadrovski zasedbi, se ob nepričakovanih izpadih, ki so na žalost del našega vsakdana, vsak izpad zaposlenega močno pozna, saj rezerv v razporedu ni. Potrebno je hitro odreagirati in iskati rešitve, da dejavnost CTD-ja nemoteno teče, vendar tega brez velike prilagodljivosti naših zaposlenih in marsikdaj tudi odpovedi že planiranih aktivnostim, zagotovo ne bi bilo mogoče.

Slabost nove organizacije dela z vidika vodje, ki je ne smemo zanemariti, je zagotovo težje usklajevanje vodenja in vodenja sistema kakovosti, kot posledica razpršene prisotnosti zaposlenih.

Slabosti organizacije dela v obliki NEE z vidika zaposlenih pa so manj nadur in posledično manjše izplačilo, manj časa za dodatne zadolžitve, ni kontinuitete dela, slabši je lahko tudi pretok informacij, še vedno je potrebno tudi veliko ročnega popravljanja v IS za vodenje prisotnosti zaposlenih. Po drugi strani pa so seveda zaposleni zadovoljni z več prostega časa in možnostjo za počitek ter krajšim delovnikom.

Vpeljava nove oblike dela je bila nenadna, zato so se pojavljali številni nepredvidljivi izzivi. Naša številna vprašanja so se reševala individualno, kar je zaradi pomanjkanja sistematičnosti pri reševanju le-teh je privedlo do neenotnosti med CTD-ji (od priprave razporedov, vnosa v IS...).

Tako velika sprememba organizacije dela, kot je bila uvedena v okviru OCTD, je zahtevala in še vedno zahteva veliko potrpežljivosti in prilagodljivosti, z vsemi slabostmi kot tudi prednostmi.

Literatura:

1. Zakon o delavnih razmerjih [cited 2024 Mar 31]. Available from: <http://pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=ZAKO5944>
2. Zakon o zdravstveni dejavnosti [cited 2024 Mar 31]. Available from: <http://pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=ZAKO214>

Zagotavljanje zalog krvnih pripravkov na dislocirani enoti Zavoda za transfuzijsko medicino v primeru elementarnih nesreč

Petra Konečnik Kresnik¹, Lidija Bohnec-Strmčnik¹ in Polonca Mali²

¹ Center za transfuzijsko dejavnost Slovenj Gradec

²Zavod RS za transfuzijsko medicino Ljubljana

petra.konecnik@ztm.si

Preskrba s krvjo je pomembno področje zdravstvenega varstva in mora biti zajeta v načrtovanju nujnih primerov in nesreč (1). Primeri načrtovanja ne vključujejo le masovnih nesreč, temveč tudi ekstremne vremenske razmere, potrese, epidemije, pandemije ter nesreče, ki jih povzroči človek, med katerimi so mnoge že ogrozile neprekinjeno preskrbo s krvjo (1). Ravno v izrednih razmerah je zadostna preskrba s krvnimi pripravki še pomembnejša, saj nezadostne zaloge lahko vodijo v večjo umrljivost in poslabšane izhode zdravljenja (2). Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) je kot del kritične infrastrukture zajet v Sistem zaščite in reševanja, zato so v skladu s tem načrtovanjem v pripravi ukrepi in postopki tudi na ZTM. Načrt za ravnanje v izrednih razmerah vključuje organiziranje, delovanje in medsebojno sodelovanje transfuzijske službe v Sloveniji ter upošteva upravno in zakonodajno podlago s področja preskrbe s krvjo ob izrednih dogodkih (2).

Elementarne nesreče in izredne razmere lahko okrnijo preskrbo s krvjo in krvnimi pripravki, kar lahko slabo vpliva na delovanje transfuzijske službe, zato je bistven pomen načrtovanja in priprav v posebnih razmerah tudi na dislocirani enoti za zagotavljanje bolnišnične preskrbe s krvnimi pripravki (2). Izredne razmere, ki so posledica elementarnih nesreč, na področju transfuzijske dejavnosti vplivajo na zbiranje in zaloge krvi in krvnih pripravkov, na sistem darovanja in transplantacij solidnih organov, tkiv, krvotvornih matičnih celic, na razpoložljivost osebja ali povečano odsotnost, logistične zmogljivosti, ukrepe za obvladovanje okužb, na zalogo zaščitne

opreme ter na komunikacijo (2). Pandemija COVID-19 je povzročila zgodovinsko krizo na področju javnega zdravja z obsežnimi socialnimi in gospodarskimi posledicami (3). Pandemija je vplivala tudi na oskrbo s krvjo, kar je na svetovnem nivoju povzročilo doslej največje in trajno pomanjkanje krvi (4, 5). Pandemija je na krvodajalstvo negativno vplivala tudi iz socialnega vidika, saj so krvodajalci morali pokazati visoko stopnjo pripravljenosti za darovanje krvi (5). Poplave na Koroškem in širše, avgusta lani, so dokaz, da moramo razmišljati o kriznih načrtih in imeti pripravljene smernice, za celovito oskrbo na nivoju matične ustanove in na dislociranih enotah. Od pojava poplave se je zato na ZTM ponovno aktiviral krizni tim za koordinacijo transfuzijske službe v Sloveniji, ki je deloval že v času pandemije COVID-19. V času epidemije smo zbiranje krvi izvajali s prilagoditvami na način, ki je zagotavljal varno okolje za krvodajalce in osebje tako na lokacijah kot na terenskih krvodajalskih akcijah, pandemija je imela vpliv na celotno zdravstveno oskrbo prebivalstva (2). V času poplav smo na podlagi preučitve tveganja za nemoteno preskrbo s krvjo in zaščite ali ogrožanja prebivalstva pred dodatnimi možnimi posledicami, kot tudi nezmožnostjo dostopa na lokacijo zaradi neprevoznih transportnih poti, sprejeli številne ukrepe. Tako smo začasno zaustavili vabljenje krvodajalcev in zbiranje krvi na Centru za transfuzijsko dejavnost Slovenj Gradec. V sodelovanju z Rdečim križem Slovenije je transfuzijska služba odvzeme krvi zato povečala na poplavno neprizadetih območjih Slovenije. S tem smo zaščitili prihode zaposlenih na delovno mesto in omogočili čim bolj nemoteno delovanje z zadostnim številom kadra. Zaradi slabih cestnih povezav, morebitnega zapiranja cest zaradi sprožitve plazov ali sanacijskih del ter oddaljenosti od matične ustanove, je bilo potrebno razmišljati tudi o alternativah morebitnega prevoza komponent na lokacijo, če bi prišlo do masovne krvavitve ali večjega števila ponesrečencev. V primeru izrednih razmer imajo tudi bolnišnice predpisane ukrepe, npr. zmanjšan operativni program, odpovedi posegov in naročanja na posege, kar se odrazi v manjši porabi krvi in krvnih komponent. Oslabljene in prekinjene telefonske linije predstavljajo izziv za alarmiranje in komunikacijo med dislocirano enoto in matično ustanovo z namenom zagotavljanja zadostnih zalog krvnih pripravkov. Prav zato je pomembno dobro sodelovanje z organizacijami Zaščite in reševanja na lokalnem nivoju. Zaradi izrednih razmer in izjemnih okoliščin se spremenijo pogoji dela, uvede se drugačen režim, zaradi večjih odsotnosti

zaposlenih pa se povečuje tudi pritisk na transfuzijske ustanove, bolnišnične službe za transfuzijsko medicino in ostalo osebje (2).

V času pojava elementarnih nesreč je pomembno, da so pripravljene načrti ukrepanja, ki jih je potrebno stalno posodabljanje in preverjati. V transfuzijski medicini lahko izredni dogodki ogrozijo nacionalno preskrbo s krvjo, krvnimi pripravki in z zdravili iz krvi na način, ki lahko predstavlja grožnjo zdravju in življenju prebivalstva (2). V času epidemije se je transfuzijska služba morala soočiti z motnjami pri zagotavljanju zadostnih zalog krvi, s spremenjenimi merili za izbor krvodajalca, spremenjenimi pogoji za organizacijo krvodajalskih akcij, spremenjenim režimom in načinom dela osebja, z dodatnimi zaščitnimi ukrepi za preprečevanje prenosa okužbe, motnjami pri dobavi materiala, opreme, reagentov in vzdrževanja opreme zaradi posledic epidemije in z njo povezanih ukrepov (2). Epidemija je prinesla tudi pozitivne učinke, kot je telefonsko naročanje krvodajalcev in posledično manjše število odklonov, saj se že ob telefonskem pogovoru izvede triaža krvodajalca in odlog darovanja krvi, kar zmanjša nepotrebne prihode krvodajalcev. Niso pa samo elementarne nesreče in izredne razmere tiste, ki zahtevajo uravnavanje zadostnih zalog krvnih pripravkov na dislociranih enotah, pač pa je upravljanje in uravnavanje zalog osnovna naloga transfuzijske službe Slovenije.

Literatura:

1. Doughty, H. Disaster planning and preparedness in transfusion medicine. Abstracts of the 33rd Regional Congress of the ISBT Gothenburg, Sweden, 17-21 June 2023. Vox Sanginuis, 2023;118(S1):1-5.
2. Rakušček A. Načrt ukrepanja v izrednih razmerah – Primer epidemije COVID-19. Specialistična naloga. Ljubljana, 2020.
3. Guidance on ensuring a sufficient supply of safe blood and blood components during emergencies. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
4. Van Denakker T A, Al-Riyami A Z, Feghali R, Gammon R., So-Osman C, Crowe E. P. et al. Managing blood supplies during natural disasters, humanitarian emergencies, and pandemics: lessons learned from COVID-19. Expert Rev Hematol. 2023 Jun-Dec;16(7):501-514.
5. Veseli B, Sandner S, Studte S, Clement M. The impact of COVID-19 on blood donations. PLoS One. 2022 Mar 24;17(3):e0265171. doi: 10.1371/journal.pone.0265171.

Znanje potrebno za samostojno opravljanje dela na dislocirani enoti

Sara Somensary, Metka Cigoj

Zavod RS za transfuzijsko medicino, CTD Nova Gorica

sara.somensary@gmail.com

UVOD

S 1.3.2013 je Oddelek za transfuziologijo Splošne Bolnišnice Nova Gorica (SBG) postal dislocirana enota Zavoda za transfuzijsko medicino Ljubljana (ZTM LJ) in se preoblikoval v Center za Transfuzijsko dejavnost Nova Gorica (CTD NG), ki je v organigram ZTM umeščen v Oddelek Centrov za transfuzijsko dejavnost (OCTD).

CTD Nova Gorica vodi Vodja CTD NG, zdravnik specialist transfuzijske medicine, ki je tudi nosilec procesov. Poleg vodje je zaposlenih še 11 oseb, od tega 2 inženirja laboratorijske medicine, 7 diplomiranih medicinskih sester, ter 2 medicinski sestri.

IZOBRAŽEVANJE IN USPOSABLJANJE

Izobraževanje je sistematično, načrtno, k cilju usmerjeno in po naprej izbranih metodah izvedeno pridobivanje znanja, spretnosti in navad ter razvijanje sposobnosti.

Usposabljanje je del izobraževanja. Vsebuje predvsem praktično delo, s katerim se udeležence usposobi za samostojno izvajanje določenih delovnih nalog.

Namen izobraževanja in usposabljanja zaposlenih je obnavljanje, posodabljanje, širjenje in nadgrajevanje ravni znanja in usposobljenosti v skladu z potrebami delovnega mesta, ter pridobivanje znanj in usposobljenosti za pravočasne odzive na spremembe in izzive iz okolja.

Za izvajanje samostojnega dela so potrebna dodatna specialna znanja, ki vključujejo uspešno opravljen tečaj transfuzijske medicine, ter strokovno usposabljanje zaposlenih za delo pod nadzorom glavnih in neposrednih mentorjev. Mentorstvo je vodenje, usmerjanje, svetovanje ter

usposabljanje kandidata za opravljanje samostojnega dela s prenosom teoretičnega znanja, nasveti, pojasnili, demonstracijami in praktičnimi nalogami.

ORGANIZACIJA SLUŽBE

Transfuzijsko službo v Sloveniji sestavljajo Zavod RS za transfuzijsko medicino (ZTM) s pripadajočimi centri za transfuzijsko dejavnost (Novo mesto, Trbovlje, Slovenj Gradec, Izola, Jesenice in Nova Gorica), Center za transfuzijsko medicino UKC Maribor s priključenima enotama na Ptuj in v Murski Soboti ter Center za transfuzijsko medicino Celje. Vsi centri/enote transfuzijske službe izvajajo dejavnost zbiranja krvi v transfuzijskih ustanovah in na terenu. Testiranja krvi in predelava v komponente potekajo na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani, Centru za transfuzijsko medicino UKC Maribor in Transfuzijskem centru SB Celje. Določen del testiranja krvi (NAT) se opravlja zgolj na ZTM. Predelana kri se vrača v centre/enote v skladu s potrebami in načrtom za oskrbo bolnišnic na njihovem območju.

Na centru za transfuzijsko medicino Nova Gorica se delo deli na dva odseka in sicer na preskrbo s krvjo in na diagnostične storitve, kjer zagotavljamo Splošni bolnišnici dr. Franca Derganca 24-urno pokritost s krvjo in krvnimi komponentami. Področje dela je zelo široko, saj zajema tako delo s krvodajalci kot tudi delo v laboratoriju.

Center za preskrbo s krvjo vključuje sprejemno pisarno za krvodajalce, ki izvaja zbiranje in preverjanje primernosti krvodajalcev za odvzem krvi in jih vpisuje v seznam naročenih krvodajalcev. Aktivnosti Centra pri vabljenju potekajo v tesnem sodelovanju z Rdečim križem Slovenije. Na CTD NG opravljamo odvzeme polne krvi na dan ponedeljka ter srede v dopoldanskem času. Poleg odvzemov polne krvi opravljamo tudi avtologne in terapevtske odvzeme. Delo s krvodajalci zahteva znanje od sprejema, določitve krvne skupine tistim krvodajalcem, ki kri darujejo prvič, vrednosti hemoglobina in krvnega pritiska, pregleda medicinskega vprašalnika, katerega opravi zdravnik, punkcije ter spremljanje njihovega počutja po odvzemu krvi do odhoda domov.

Center za diagnostične storitve vključuje laboratorij v katerem se ročno izvajajo vse predtransfuzijske preiskave. Delo obsega sprejem vzorcev in naročil za pripravo krvnih komponent, samo izvedbo laboratorijskih preiskav, odčitavanje izvidov s pomočjo sistema telekonzultacije, naročanje krvnih komponent ter izdaje krvi in krvnih komponent.

PREDTRANSFUZIJSKE PREISKAVE

Gre za preiskave določanja skladnosti med krvodajalci in bolniki v različnih antigenskih sistemih krvnih celic. Kjer se predvideva transfuzija krvi, je potrebno bolniku določiti krvno skupino ABO, RhD in Kell ter opraviti navzkrižni preizkus. Tako zagotovimo, da po transfuziji ne bo prišlo do neželenih reakcij zaradi eritrocitnih protiteles. Bolniki vedno prejmejo kri svoje krvne skupine ABO in RhD, le v izrednih primerih je dovoljeno transfundirati kri drugih krvnih skupin. Pri določenem odstotku bolnikov ugotovimo prisotnost eritrocitnih protiteles, kar zahteva izvajanje dodatnih preiskav za identifikacijo le teh. Na osnovi odkrite specifičnosti bolniku transfundiramo skladne eritrocitne komponente. Po opravljenih imunohematoloških (IH) preiskavah vzorce arhiviramo in shranimo za obdobje 3 let.

PRENATALNE PREISKAVE

Med nosečnostjo je potrebno vsaki nosečnici določiti krvno skupino ABO, RhD, Kell in indirektni Coombsov test, ter določiti morebitno prisotnost označevalcev okužb. Namen IH preiskav je odkriti protitelesa, ki lahko povzročijo hemolitično bolezen ploda in novorojenčka, in preprečiti tvorbo teh protiteles tam, kjer je to mogoče. V primeru, da protitelesa odkrijemo, je potrebno ustrezno vodenje in morebitno zdravljenje nosečnice, ki pa se izvaja na ZTM LJ.

SAMOPLAČNIŠKE PREISKAVE

V sklopu samoplačniških preiskav opravljamo odvzem krvi in preiskave za določanje krvne skupine ter odvzem in svetovanje za ugotavljanje označevalcev okužb. Zdravnik po strokovni presoji razširi obseg in vsebino svetovanja ali ponudi pomoč pri nadaljevanju strokovne obdelave v drugih ustreznih in pristojnih inštitucijah.

DEŽURNA SLUŽBA

V času dežurne službe je na CTD NG prisotna ena usposobljena diplomirana medicinska sestra ali inženir laboratorijske medicine, ki opravlja sam vsa dela v laboratoriju v sodelovanju z dežurnim zdravnikom, ki je praviloma na drugi oddaljeni lokaciji. Poleg tega, da pacient prejme kri varno in pravočasno (redna in nujna izdaja krvi in krvnih komponent) je zadolžen tudi za izredno naročanje krvi in krvnih komponent ter racionalno upravljanje z njihovimi zalogami. V času dežurstva sprejema klice krvodajalcev in jih naroča za darovanje krvi. Med delom mora imeti pregled nad celotnimi prostori (okvare, izpadi, vlomi, alarmi) in ob težavah tudi ustrezno ukrepati.

TELEMEDICINA

Z uvedbo telemedicine (TM) se poveča varnost bolnikov pri procesu zdravljenja s krvjo in krvnimi komponentami in zagotavlja se najvišjo možno mero strokovnosti rezultatov IH preiskav, tudi v primeru, ko na centru/enoti za transfuzijsko dejavnost ni navzoč zdravnik specialist transfuzijske medicine.

Telekonzultacijski sistem omogoča prenos podatkov na daljavo, varno, zaupno in kakovostno povezavo, izvajanje storitev na daljavo, sledljivost in varovanje podatkov.

ZAKLJUČEK

Delo sestree oz. inženirja na dislocirani enoti poteka v sodelovanju z zdravnikom oz. dežurnim telekonzultantom in je strokovno, odgovorno, samostojno, zahteva veliko znanja, natančnosti, zbranosti ter nenehnega izobraževanja. Cilj je zagotoviti pravočasno in ustrezno transfuzijo za pravega pacienta vendar je potrebno poudariti, da sta za varno transfuzijo ključnega pomena prava identifikacija bolnika in odvzem vzorca, ki potekata na oddelku.

LITERATURA

1. <http://wordpress.ztm.local/wp-content/uploads/2022/07/Podpisan-Pravilnik-o-izobra%C5%BEevanju-n-usposabljanju-zaposlenih-na-ZTM-2022.pdf>

2. Pravilnik_NOTORG_KV_novi_org_060224.pdf (ztm.local)
3. <http://www.ztm.si/ztm/transfuzijska-sluzba/>
4. <http://www.ztm.si/diagnosticne-storitve/imunohematoloske-preiskave/>
5. Petek M (2014). Uvedba in izboljšave telemedicine na področju transfuziologije. V: zbornik predavanj z recenzijo, 2. Simpozij z mednarodno udeležbo, Rogaška Slatina, 4.-6. april 2014. Ljubljana: Zbornica zdravstvene in babiške nege Slovenije, Zveza strokovnih društev medicinskih sester, babic in zdravstvenih tehnikov Slovenije, Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji, 188.

Bolnišnični transfuzijski odbor- povezovalni člen med zdravstveno ustanovo in transfuzijsko službo

Danijela Uležič Paučič

Center za transfuzijsko medicino UKC Maribor

UVOD

Splošna bolnišnica Murska Sobota (SBMS) je regijska zdravstvena ustanova za Pomurje. Za potrebe SBMS dejavnost preskrbe s krvjo izvaja Enota za transfuzijsko dejavnost Murska Sobota (ETDMS), ki deluje kot dislocirana enota Centra za transfuzijsko medicino UKC Maribor (CTMMB) po reorganizaciji transfuzijske službe v SV Sloveniji leta 2009. Na podlagi 17. člena Zakona o preskrbi s krvjo (ZPKrv-1) je direktor SBMS dr. Bojan Korošec za izvajanje nadzora nad uporabo krvi in ravnanja s krvjo v SBMS imenoval leta 2014 Bolnišnični transfuzijski odbor (BTO). Direktor SBMS je imenoval tudi predsednika BTO in šest članov BTO. Koordinator sistema vodenja kakovosti SBMS mag. Zdenka Gomboc, prof. zdr. vzg. ima povezovalno vlogo v delovni skupini BTO in sodeluje pri izboljševanju kakovosti in varnosti storitev.

NAMEN

Vloga BTO v SBMS je definirana večplastno, kar mu omogoča, da uspešno opravlja svojo vlogo povezovalnega člena med SBMS in CTMMB na strokovnem področju in da hkrati rešuje potencialno konfliktne situacije.

MATERIAL IN METODE

Bolnišnični transfuzijski odbor je ena od delovnih skupin na nivoju SB MS, ki delujejo z namenom izboljševanja kakovosti in varnosti zdravstvenih storitev na področju zdravljenja s krvjo.

Za potrebe kadra iz SBMS in njihovega dela s pacienti je pripravljeno obsežno organizacijsko navodilo: Sprejem, hranjenje in izvajanje transfuzije.

Po presoji AACI 2015 se z namenom odprave neskladja na področju transfuzijske dejavnosti začne spremljanje šestih kazalnikov kakovosti.

Na sestankih BTO rešujemo tudi potencialno konfliktne zadeve med SB MS in CTM MB na primer: naročnik dolgo čaka na izdajo krvi glede na čas naročila in čas dobave krvi na oddelek, premajhne zaloge krvi zaradi nerealiziranih transportov na relaciji Maribor - Murska Sobota, naročnik naroča cenejšo komponento trombocitnega koncentrata (obsevane) in dobi 2-krat dražjo komponento (trombocite inaktivirane s psoralenom).

REZULTATI

Z realiziranimi sklepi BTO omogočamo zaposlenim v SB MS strokovno in varno delo pri vseh opravilih povezanih s transfuzijo krvi in transfuzijskimi preiskavami, hkrati z mesečnim spremljanjem kazalnikov kakovosti preverjamo izvajanje dobre prakse na področju transfuzijske medicine po oddelkih SB MS.

ZAKLJUČEK

Delovna skupina BTO v SB MS deluje kot uspešni povezovalni člen med SB MS in CTM MB.

Področje dela transfuzijske medicine in preskrba s krvjo sta povezani s krvodajalci in njihovim prostovoljnim in neplačanim darovanjem krvi. Vse kar se dogaja v medijih zaradi tega ker ni kakovostne komunikacije med nezadovoljnimi odjemalci transfuzijskih storitev (zdravstveno ustanovo) in transfuzijsko službo lahko negativno vpliva na odziv krvodajalcev, da brezplačno darujejo kri. Konflikti so sestavni del življenja, ne moremo jih dokončno odpraviti, moramo pa stremeti k temu, da jih rešujemo s kakovostno komunikacijo na primer znotraj BTO.

Po potrebi se v reševanje konflikta znotraj BTO vključi tudi izkušen mediator iz Zdravniške zbornice, ki ustvari pogoje, da se nasprotne strani slišijo in s skupnimi močmi (kompromisi na obeh straneh!) najdejo rešitve, ki so sprejemljive za obe strani.

Presaditev krvotvornih matičnih celic (ZTMS)

Alogenska transplantacija KMC

Klara Šlajpah

KO za hematologijo, UKC Ljubljana

klara.slajpah@kclj.si

Alogenska presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC) je pomembna metoda za zdravljenje nekaterih malignih in nemalignih bolezni kostnega mozga (KM). PKMC ponuja možnost dolgoročnega preživetja bolnikom z visokim tveganjem za ponovitev bolezni, ponovljenimi ali refraktarnimi malignomi, ki jih ni mogoče pozdraviti z drugimi pristopi, in bolnikom z odpovedjo KM, vključno s podedovanimi boleznimi, ki vplivajo na hematopoezo.

S PKMC nadomestimo maligno (ali okvarjeno) hematopoezo z uporabo celic kostnega mozga (CKM) zdravega darovalca. CKM lahko pridobimo iz periferne krvi (PK), KM ali popkovnične krvi (UCB), pri čemer ima vsaka izmed metod svoje prednosti in slabosti. Glede na osnovno bolezen (tj. maligno ali nemaligno) imajo prednost določeni viri presadka, pri čemer je treba upoštevati starost prejelnika in sočasne bolezni. Najpogostejši vir presadka za PKMC je PK, vendar imajo v nekaterih okoliščinah prednost presadki KM. Pri odraslih, pri katerih se izvaja alogenična PKMC zaradi malignega obolenja kot prvo izbiro uporabljamo presadke PK. Najpomembnejši dejavnik pri izbiri darovalca za presaditev je imunska skladnost med prejemnikom in darovalcem na HLA lokusih. Za približno 80 % do 90 % pacientov, ki potrebujejo PKMC, je možno najti ustreznega darovalca, pri več kot polovici vseh bolnikov najdemo popolnoma skladnega darovalca. V zadnjih letih se vse več izvaja haploidentična PKMC, kjer so darovalci pogosto otroci ali starši, ki delijo polovico haplotipa. Ta metoda je koristna, ko je čas bistvenega pomena za presaditev in z novimi načini kondicioniranja in imunosupresivne profilakse (anti-timocitni globulin in post transplantacijski ciklofosamid) tudi varna izbira presaditve.

Kondicioniranje pred PKMC (kemoterapija in/ali radioterapija) se izvaja za zmanjšanje bremena boleznih in preprečevanje zavrnitve darovalčevih CKM, hematopoeza se nato obnovi z infuzijo presadka zdravih CKM darovalca. Pri mieloablativni PKMC bolnike pred presaditvijo zdravimo z visokimi odmerki citostatikov in/ali obsevanjem vsega telesa, s ciljem odstraniti vse maligne oz. bolezensko spremenjene celice, ob tem pa nepovratno uničimo tudi preostalo hematopoezo. Z novimi oblikami kondicioniranja, z zmanjšano intenzivnostjo in nemieloablativnim, lahko zdravljenje s PKMC omogočimo tudi starejšim bolnikom. V tem primeru bolniki dobijo citostatike v odmerkih, ki zagotovijo hudo, vendar prehodno in reverzibilno okvaro KM. Ker zaradi nižjih odmerkov citostatikov ne uničimo vseh malignih celic, je za učinkovito zdravljenje ključna reakcija presadka proti levkemiji (GvL), zaradi česar je pomembno, da bolezensko breme ni preveliko. Za oceno primernosti za PKMC je potrebno upoštevati tako bolnikove značilnosti kot bolezenske dejavnike. Starost sama po sebi ni kontraindikacija za PKMC, bolniki brez resnih pridruženih boleznih so lahko kandidati za PKMC vse do starosti 70 – 75 let.

Bolezen presadka proti gostitelju

Akutna (aGvHD) in kronična (cGVHD) bolezen presadka proti gostitelju sta poleg oportunističnih okužb glavna zapleta in vzroka ne-relapsne umrljivosti (NRM) po PKMC. Akutni GvHD je sistemska vnetna bolezen, ki se pojavi pri 30 % - 60 % bolnikov. Glavna mesta manifestacije v telesu so črevesje, koža in jetra. Profilaksa z zdravili ključno vpliva na resnost in prognozo GVHD. Izbira zdravila, odmerka in trajanja temeljijo na posameznih dejavnikih tveganja, kot so skladnost med darovalcem in prejemnikom, stanje remisije osnovne bolezni in starost prejemnika. Zdravljenje aGvHD je odvisno od njene resnosti. Če je bolezen stopnje II, je indicirano sistemsko imunosupresivno zdravljenje na osnovi kortikosteroidov, ki mu pogosto pridružimo zunajtelesno fotoferezo (ECP). Z uporabo ruxsolutiniba pri bolnikih z rezistentno ali na kortikosteroide neodzivno boleznijo se je preživetje teh bolnikov pomembno izboljšalo.

Kronični GvHD je dolgotrajna reakcija imunskega sistema darovalca proti tkivu prejemnika, ki se kaže podobno kot avtoimunske motnje in pomembno vpliva na kakovost življenja. Pojavi se pri približno 50 % bolnikov, običajno 2 do 18 mesecev po PKMC. Za postavitev diagnoze morajo biti

prisotni jasni klinični simptomi/manifestacija ali histološka potrditev. Terapija je odvisna od resnosti cGVHD in prizadetosti organa. Vključuje lokalne ukrepe, sistemske kortikosteroide in ECP, pri bolnikih z rezistentno ali neodzivno boleznijo pa ruksolitininib ali ibrutinib. Z uporabo prvega se je tudi pri bolnikih s cGVHD pomembno izboljšalo preživetje, saj je zlasti hud cGVHD vzrok za približno 25 % smrti po PKMC. Bolniki s cGVHD se pogosto soočajo z dolgotrajno obolevnostjo in zaradi pridružene imunske pomanjkljivosti potrebujejo skrbno spremljanje in profilakso pred okužbami.

Okužbe po PKMC

Okužbe po PKMC predstavljajo veliko tveganje tako za peri-transplantacijsko (TRM) kot NRM, vendar so se rezultati zaradi napredka v zadnjih letih izboljšali. Pomembni so preventivni ukrepi in zdravljenje bakterijskih, glivičnih in virusnih okužb. Po PKMC obstaja povečano tveganje glivičnih okužb, čeprav so te z učinkovito profilakso, ki vključuje uporabo azolov z delovanjem na plesni (posakonazol) in uporabo presadkov PK vse manj pogoste. Virusne okužbe, zlasti citomegalovirus (CMV), so prav tako pogoste po PKMC, s preprečevanjem in preventivnim zdravljenjem, ki vključuje uporabo letermovirja za profilakso CMV se pojavnost in umrljivost prav tako zmanjšuje. V boju proti virusnim okužbam se je kot obetavno izkazalo adoptivno celično zdravljenje s T limfociti, usmerjenimi proti specifičnim virusom.

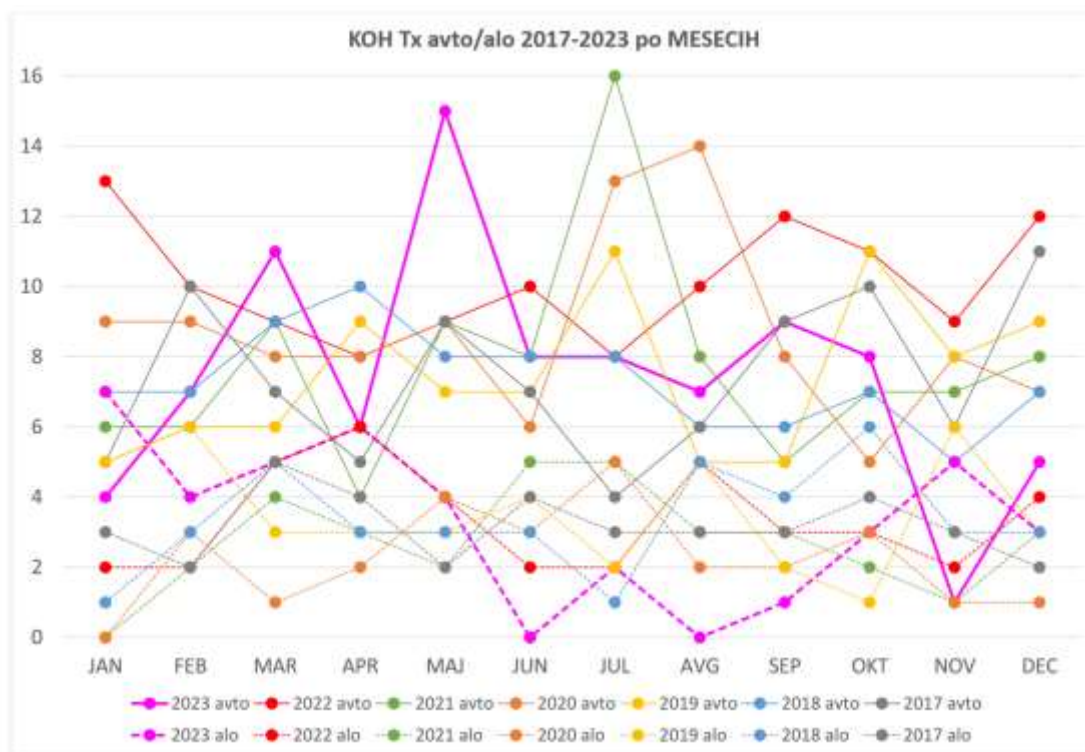
Pozni zapleti zdravljenja s PKMC

Po PKMC se lahko pojavijo različni pozni zapleti, ki vplivajo na različne organske sisteme in lahko povečajo obolevnost, pozno umrljivost in zmanjšajo kakovost življenja bolnikov. Pogosti zapleti poleg cGVHD vključujejo srčno-žilne bolezni, prizadetost pljuč, endokrinih in spolnih žlez, ledvične težave, prenasičenost z železom, okužbe in sekundarne rakave bolezni. Pomembno je redno spremljanje bolnikov in pravočasno poročanje o morebitnih spremembah za zgodnje prepoznavanje in zdravljenje zapletov. Prav tako je pomembno obvladovanje dejavnikov tveganja za kardiovaskularne bolezni in ohranjanje zdravega življenjskega sloga. Bolniki po PKMC se soočajo tudi s psihološkimi izzivi, kot so utrujenost, anksioznost, depresija in težave pri vključevanju v

socialno in delovno okolje. Pomembno je, da so bolniki in zdravstveni delavci pozorni na vse te vidike za zagotavljanje celostne oskrbe in izboljšanje kakovosti življenja po presaditvi.

Naši podatki

Na KO za hematologijo UKC Ljubljana smo v obdobju med 2017 in 2021 opravili 164 alogenskih PKMC. Glede na poročilo EBMT je bilo v tem obdobju 1-letno preživetje 80 %, brez napredovanja bolezni eno leto po PKMC je bilo 73 % bolnikov. Leta 2023 smo opravili 40 alogenskih PKMC, enako kot leto prej, od tega 25 (62,5 %) nesorodnih, 10 (25 %) sorodnih in 5 (12,5 %) haploidentičnih PKMC. 19 % bolnikov presajenih leta 2022 je utrpelo težek aGVHD (gr III in IV), težek cGVHD (gr. II in III) pa 22 % bolnikov.



Graf 1: Število PKMC na KOH UKC Ljubljana med 2017 in 2023 po mesecih.

Zaključek

PKMC je eden izmed najzahtevnejših medicinskih postopkov, ki se uporablja predvsem pri bolnikih

z napredovalimi hematološkimi raki. Kljub visokim stroškom in možnim zapletom, vključno z redkimi okužbami, ta postopek ponuja možnost ozdravitve za paciente, ki sicer ne bi imeli možnosti preživetja. Nedavni napredki v kondicioniranju, podpornem zdravljenju in uporabi haploidentičnih darovalcev so omogočili, da je presaditev dostopna večjemu številu bolnikov in da je mogoče zdravljenje izvesti praktično pri vseh kandidatih. Izboljšanja v preprečevanju in zdravljenju GVHD ter napredki v diagnostiki in zdravljenju okužb so pripomogli k znatnemu izboljšanju preživetja in uspešnosti presaditve.

Literatura:

1. Khan I, Shah NN, Ulrickson M. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy. In: Altman JK, Weidner Mandernach M, Naik RP, Ulrickson M, editors. American Society of Hematology Self-Assessment Program. Washington, DC: ASH; 2022. p. 381–403.
2. Deeg HJ. Disease progression , treatments , hospitalization , and clinical outcomes in acute GVHD : a multicenter chart review. 2022;(August 2021).
3. Uzay A, Langmuir P, Hollaender N, Ph D, Gowda M, Pharm D, et al. Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Chronic Graft-versus-Host Disease. 2021;
4. Sever M, Zver S, editors. Bolnik po presaditvi krvotvornih matičnih celic v ambulantni družinskega zdravnika. Ljubljana: Pliva; 2020.
5. Melkić E, Filipčič J, editors. Pozne posledice zdravljenja rakavih krvnih bolezni. Mengeš: Društvo bolnikov s krvnimi boleznimi Slovenije; 2022.

Pogled onkologa na presaditev krvotvornih matičnih celic

Aleš Christian Mihelač

Oddelek za zdravljenje limfomom, Onkološki inštitut Ljubljana

amihelac@onko-i.si

Kemoterapija še vedno ohranja vlogo prve linije v zdravljenju agresivnih limfomskih obolenj. Kljub temu so lahko te bolezni bodisi neodzivne (refraktarne) na terapijo, bodisi se ponovijo po določenem času. Pri ne-Hodgkinovih limfomih znaša ta delež v grobem 20-30 %, pri Hodgkinovem limfomu pa okoli 15 %. V primeru, da je bolnik v dobri psihofizični kondiciji, se ob progresu ali ponovitvi lahko uporabi reševalno kemoterapijo in v primeru kemosenzitivnosti nadaljuje s konsolidacijsko visokodozno kemoterapijo, kateri sledi avtologna presaditev krvotvornih matičnih celic. Visokodozna kemoterapija (tudi mieloablativna kemoterapija) namreč poleg limfomskih celic uniči tudi zdrave zarodne krvotvorne celice v kostnem mozgu, zato s presaditvijo krvotvornih matičnih celic (KMC), ki jih pri bolniku zberemo še pred visokodozno kemoterapijo, obnovimo sposobnost kostnega mozga za tvorbo novih krvnih celic. (1)

Glede na vrst limfomskega obolenja in potek bolezni, odgovor na terapijo v prvi liniji zdravljenja (tj. remisija bolezni, morebitno napredovanje bolezni ali kasnejša ponovitev) se torej lahko odločimo za premostitveno/reševalno kemoterapijo (npr. po shemi DHAP - deksametazon, visokodozni citarabin in cisplatin) in nadaljevanje z visokodozno kemoterapijo (npr. BEAM - bendamustin, etopozid, citarabin in melfalan) ter presaditvijo KMC, katere se zbere iz periferne krvi po stimulaciji, najpogosteje z rastnimi dejavniki (granulocitne kolonije stimulirajoči faktor, G-CSF). (2)

Omenjenega zdravljenja se poslužujemo pri difuzno velikoceličnem limfom B in njegovih variantah (velikocelični limfom B s presežkom T limfocitov, primarni mediastinalni velikocelični limfom B), primarnih limfomih osrednjega živčevja, anaplastičnemu velikoceličnemu limfomu, nekaterih T celičnih limfomih (periferni limfom T brez drugih oznak, angioimunoblastni limfom T, limfom T

povezan z enteropatijo) povečini v prvi ali drugi kemosenzitivni ponovitvi bolezni ali pri bolezni, neodzivni na prvo zdravljenje, le izjemoma pa za utrditev prvega popolnega ali delnega odgovora pri velikem tveganju za ponovitev. Pri limfomu plaščnih celic nadaljujemo s tovrstnim zdravljenjem po doseženem delnem ali popolnem odgovoru na kemoterapijo prvega reda, izjemoma 2. reda, pri folikularnem limfomu pa le še izjemoma po dosežnem delnem ali popolnem odgovoru na kemoterapijo drugega reda. Alogenska presaditev KMC pride v poštev pri akutni limfoblastni levkemiji ter limfoblastnem limfomu celic B in T v prvi remisiji bolezni pri bolnikih s slabimi napovednimi dejavniki ter v primeru ponovitve bolezni, odzivne na zdravljenje drugega reda, v določenih primerih pa pride v poštev avtologna presaditev KMC s Ph pozitivno ALL, ki niso sposobni alogenske presaditve KMC. (2)

V primeru na prvo zdravljenje neodzivnega difuznega velikoceličnega limfoma B ima prednost CAR-T terapija, vendar pa tovrstno zdravljenje nemalokrat ni na voljo zaradi proizvodnih omejitev in tudi družbeno-ekonomskih vzrokov. (2, 3)

Pri klasičnem Hodgkinovem limfomu se za tovrstno zdravljenje odločimo predvsem pri bolezni, neodzivni na prvo zdravljenje (progres med prvim zdravljenjem ali prehodni odgovor, ki traja manj kot tri mesece po zaključenem zdravljenju). Alogenska presaditev KMC pride v poštev pri bolnikih, ki so bili predhodno zdravljeni z brentuksimab vedotinom in avtologno presaditvijo KMC ter imajo le delni odgovor ali progres po zdravljenju z zaviralci imunskih kontrolnih točk. (2)

Dandanes so avtologne krvotvorne matične celice iz periferne krvi praktično nadomestile matične celice iz kostnega mozga, saj je odvzem enostavnejši, možnost kontaminacije s tumorskimi celicami je manjša v primeru infiltracije kostnega mozga z limfomom, poleg tega pa je vgnezditev presadka hitrejša. (4)

Na uspešnost mobilizacije krvotvornih matičnih celic vpliva več dejavnikov, in sicer starost (pod 60 let proti 60 let in več) in teža bolnika, zvrst limfomskega obolenja, shema in število predhodni kemoterapij, infiltracija kostnega mozga ob pričetku zdravljenja, obseg okrevanja krvne slike po predhodni kemoterapiji, predhodno obsevanje, stanje obolenja ter zvrst uporabljenega citokina za mobilizacijo in shema ter odmerik kemoterapije, če je bila le-ta uporabljena za mobilizacijo

(npr. visokodozni ciklofosfamid). V splošnem naj bi bolniki s klasičnim Hodgkinovim limfomom boljše mobilizirali KMC kot pa bolniki z ne-Hodgkinovim limfomom, kar je verjetno vsaj deloma povezano s starostjo bolnikov (bolniki s Hodgkinovim limfomom so načeloma mlajši bolniki). Pomembni napovedni dejavniki so tudi celularnost kostnega mozga (pod 30 % proti 30 % in več) ter raven trombocitov (pod $150 \times 10^9/L$ proti $150 \times 10^9/L$ in več). V splošnem se ocenjuje, da se delež bolnikov, ki slabo mobilizirajo krvotvorne matične celice, giblje nekje med 5 % pa do 40 %. Definicija slabših mobilizatorjev v literaturi ni dorečena, ponekod je mejna vrednost 1×10^6 CD34+ celic/kg telesne teže, drugod pa pod 2×10^6 CD34+ celic/kg telesne teže. Pri takšnih bolnikih se lahko poslužimo novejših pristopov za mobilizacijo, npr. pleriksaforja, ki poveča številno celic brez toksičnih stranskih učinkov. (4, 5)

Literatura

1. Zahid U, Akbar F, Amaraneni A, Husnain M, Chan O, Riaz IB, et al. A Review of Autologous Stem Cell Transplantation in Lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep.* 2017 ; 12(3): 217-26.
2. Jereršek Novaković B. (ur). Priporočila za obravnavo bolnikov z malignimi limfomi. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; 2024 [citirano dne 27.3.2024]. Dostopno na: https://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/Strokovna_knjiznica/smernice/Priporocila_za_obravnavo_bolnikov_z_malignimi_limfomi_2024.pdf
3. Momoki M, Katsube A, Kawashima M, Suzuki K, Fukushima R, Gunji T, et al. The Role of High-Dose Regimens Followed By Autologous Stem Cell Transplantation for Salvage Chemotherapy-Sensitive DLBCL Patients. *Blood* 2023; 142 (Suppl. 1): 7063.
4. Hosing C, Saliba RM, Ahlawat S, Körbling M, Kebriaei P, Alousi A, et al. Poor hematopoietic stem cell mobilizers: a single institution study of incidence and risk factors in patients with recurrent or relapsed lymphoma. *Am J Hematol.* 2009; 84(6): 335-7.
5. de Almeida-Neto C, Rocha V, Moreira FR, Hamasaki DT, de Farias MC, Arrifano AM, et al. Validation of a formula predictive of peripheral blood stem cell yield and successful collection in healthy allogenic donors. *Hematol Transfus Cell Ther* 2020; 42(2): 164-5.e5.

Presaditve krvotvornih matičnih celic pri otrocih

Simona Ivančan

Klinični oddelek za hematologijo in onkologijo Pediatrične klinike, UKC Ljubljana

simona.avcin@kclj.si

Presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC) je pri otrocih in mladostnikih uveljavljen in standarden postopek zdravljenja. Hiter razvoj celičnega zdravljenja, širjenje indikacij in dopolnjevanje postopkov so v zadnjih letih doživeli izjemen razmah. Povečalo se je število preživelih bolnikov, močno se je izboljšala kakovost življenja. Hitra prepoznavna in učinkovito zdravljenje zapletov ter dolgotrajno sledenje bolnikov so glavni dejavniki, ki so v pediatrični populaciji izboljšali 5-letno preživetje po PKMC.

Avtologna PKMC predstavlja del standardnega zdravljenja pri otrocih s solidnimi tumorji, kot so visoko maligni sarkomi, nevroblastom, tumorji osrednjega živčevja visokega gradusa, ter relaps Hodgkinovega limfoma.

Alogenska PKMC je del standardnega zdravljenja akutnih levkemij z velikim tveganjem za ponovitev, relaps ne-Hodgkinovega limfoma, mieloproliferativnih neoplazem ter prirojelih ali pridobljenih oblik odpovedi kostnega mozga. Ostale indikacije za alogensko PKMC pri otrocih so težke prirojene okvare imunosti, huda oblika adrenolevkodistrofije, mukopolisaharidoze, osteopetroza in težke oblike hemoglobinopatij.

Skupno dolgoročno preživetje po PKMC pri otrocih in mladostnikih znaša od 50 % do 70 %. Pri nemalignih boleznih, ki jih zdravimo s PKMC, je dolgoročno preživetje daljše, v razvitih državah celo nad 85 %.

Umrljivost po PKMC pri otrocih znaša od 15 % do 50 %, vzrok za umrljivost je v polovici teh primerov ponovitev ali progres osnovne bolezni, druga polovica otrok pa umre zaradi peri- ali posttransplantacijskih zapletov.

Spodaj so opisane bistvene razlike pri obravnavi pediatričnih bolnikov v primerjavi z odraslimi s stališča transfuzijske medicine.

Izbira darovalca

V skladu s tem, da otroci niso majhni odrasli, je pomembno dejstvo, da so razlike predvsem v indikaciji za PKMC.

Indikacije za PKMC pri otrocih z rakom so se tako tekom časa spreminjale ob upoštevanju razmerij med preživetjem po prvi liniji zdravljenja, ponovitvi bolezni in po PKMC, ki je delno odvisno tudi od HLA skladnosti. Podobno se je upravičenost do PKMC pri nemalignih boleznih povečevala skladno z zmanjšanjem posttransplantacijskih zapletov.

Glede na relativno majhno število sorojencev v sodobnih družinah razvitega sveta, ima manj kot 25 % otrok, ki potrebujejo PKMC, HLA skladnega sorojenca. Posledično pri 75 % bolnikov izvedemo iskanje HLA skladnega nesorodnega darovalca.

Izbira alternativnih darovalcev, kot so haploidentični sorodni darovalci, popkovnična kri ali neskladni nesorodni darovalci, je odvisna od izkušenj centra, nujnosti PKMC in prisotnosti darovalčevih specifičnih anti-HLA protiteles.

Kar zadeva telesno težo, ta variira od nekaj kg pri dojenčku do mladostnika z odraslimi telesnimi merami. Manjša kot je teža prejemnika, manjša je količina zahtevanega absolutnega števila KMC v presadku, zaradi česar je postopek odvzema enostavnejši in krajši. Optimalen odmerek KMC predstavlja manjše tveganje za zavrnitev presadka, ki je najmanjše pri otrocih.

Zbiranje KMC pri otrocih

Zbiranje ali pridobivanje KMC pri otrocih predstavlja posebno entiteto, ne le zaradi drugačnih fizioloških in anatomskih razmer, ampak tudi zaradi psiholoških, pravnih in etičnih vprašanj pri mladoletnikih. V primerjavi z odraslimi darovalci, morajo starši in/ali zakoniti skrbniki prisotni in soglasni tekom celotnega postopka, enako potrebujemo tudi pisno privolitev otroka od dopolnjenega 8. leta starosti, skupaj s starosti primerno ustno in pisno obrazložitvijo.

Glavna razlika v primerjavi z odraslimi je majhna telesna teža; težave pri venskem dostopu, zlasti pri levkaferizi in večja potreba po nadomeščanju krvnih celic pri klasičnem odvzemu KMC iz kostnega mozga.

Pri otrocih so indikacije in postopki za avtologno zbiranje KMC del standardne klinične prakse, v večini primerov v namen zbiranja avtolognih KMC opravimo levkaferozo periferne krvi po standardnem postopku.

Kadar so otroci mlajši in/ali lažji od 15 kg, imamo na Kliničnem oddelku za hematologijo in onkologijo Pediatrične klinike za zbiranje KMC z levkaferozo periferne krvi, pripravljen tudi SOP zaradi specifičnih potreb in možnih zapletov pri tej skupini otrok. Zaradi majhnega lumna perifernih ven potrebujejo za zagotavljanje zadostnega pretoka med levkaferozo vstavitvev dializnega katetra, praviloma v eno od femoralnih ven, ki se vstavi v splošni anesteziji. Nato transfuziološka ekipa prične postopek levkaferoze v namen zbiranja KMC. Kadar je otrok majhen, nemiren, boječ ali ima morda motnjo v razvoju, se nato premesti v Enoto za intenzivno terapijo otrok, kjer ostane globoko sediran tekom celotnega postopka levkaferoze. Tako imamo pri takšnem bolniku sočasno dve stanji, splošno anestezijo in levkaferozo, ki ju moramo monitorirati, zagotavljati zadosten pretok preko katetra ter vzdrževati elektrolitno in acidobazno ravnotežje. Obenem je to obdobje praviloma v času okrevanja kostnega mozga po bloku kemoterapije, ko ima bolnik še trombocitopenijo in anemijo zaradi zdravil, tako da je večinoma potrebno tudi nadomeščanje krvnih pripravkov.

V primeru alogenskega darovanja je pri zbiranju KMC pri mladoletnem darovalcu potrebno upoštevati, da je lahko darovalec le, če je optimalna izbira kot HLA skladni sorodnik. V primeru alogenskega odvzema KMC pri mladoletniku moramo nujno imeti tudi pozitivno mnenje Komisije RS za medicinsko etiko.

Pri otrocih do 16. leta opravljamo klasični odzem kostnega mozga, po tem letu pa odzem KMC z levkaferozo iz periferne krvi po predhodni 5-dnevni stimulaciji z granulocite stimulirajočim rastnim faktorjem, enako kot pri odraslih.

Osnovne tehnike zbiranja KMC so precej podobne tehnikam, ki se uporabljajo pri odraslih. Za odvzem kostnega mozga punktiramo iliakalne kriste.

Bolezen presadka proti gostitelju (GVHD)

V razpredelnici 1 so prikazani še stadiji GVHD, ki se razlikujejo od klasifikacije pri odraslih, kot enega od glavnih dejavnikov tveganja za posttransplantacijsko obolevnost in umrljivost.

Razpredelnica 1: Stadiji akutnega GVHD, klasifikacija po posameznih organih za otroke:

Stadij GVHD	Kožni izpuščaj	GI trakt količina driske	Jetrni testi vrednost bilirubina
I	< 25 % površine	1019,9 ml/kg/dan	34–50 µmol/L
II	25–50 % površine	2030 ml/kg/dan	51–102 µmol/L
III	Generalizirana eritroderma	nad 30 ml/kg/dan	103–255 µmol/L
IV	Generalizirana eritroderma z bulami in deskvamacijo	Hude bolečine v trebuhu, krvava driska, z ileusom ali brez njega	> 255 µmol/L

Zaključek

Z napredkom tehnologije, znanja in zdravil se povečuje tudi obseg indikacij za PKMC pri otrocih. Ob povečevanju števila izvedenih posegov se povečuje in izpopolnjuje tudi znanje o prepoznavanju in zdravljenju zapletov PKMC. Zavedati se moramo, da je pri otrocih PKMC še vedno postopek zdravljenja z visoko smrtnostjo, predvsem zaradi zapletov, ki se lahko pojavijo. Pomembno je ustrezno multidisciplinarno sodelovanje transplantacijske ekipe, ki vključuje tudi transfuziološko ekipo, od začetka izbire darovalca, zbiranja, infuzije KMC do morebitnega zdravljenja posttransplantacijskih zapletov z zunajtelesno fotoforezo, infuzijo darovalčevih limfocitov, iskanjem novega darovalca v primeru ponovitve bolezni ali zavrnitve presadka.

Literatura:

1. <https://zhs.si/boagewha/2021/04/bolnik-po-presaditvi-kmc.pdf>.
2. https://www.slovenskapediatrija.si/portals/0/clanki/2014/2014_suppl_21_076-081.pdf
3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37284518/>
4. https://www.ebmt.org/sites/default/files/2019-01/2019_Book_TheEBMTHandbook.pdf
5. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821671-2.00003-9>
6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30504315/>

Zbiranje in shranjevanje krvotvornih matičnih celic na Zavodu RS za transfuzijsko medicino

Marko Cukjati

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

marko.cukjati@ztm.si

Transfuzijska medicina sodeluje pri presajanju krvotvornih matičnih celic (KMC) na več področjih: preskrba s krvnimi pripravki, imunohematološke, mikrobiološke preiskave in preiskave tkivne skladnosti, register prostovoljnih darovalcev, aferezni odvzemi, obdelava celičnih pripravkov, zamrzovanje in shranjevanje v kriobanki, izvajanje terapevtskih aferez in proizvodnja zdravil za napredno zdravljenje.

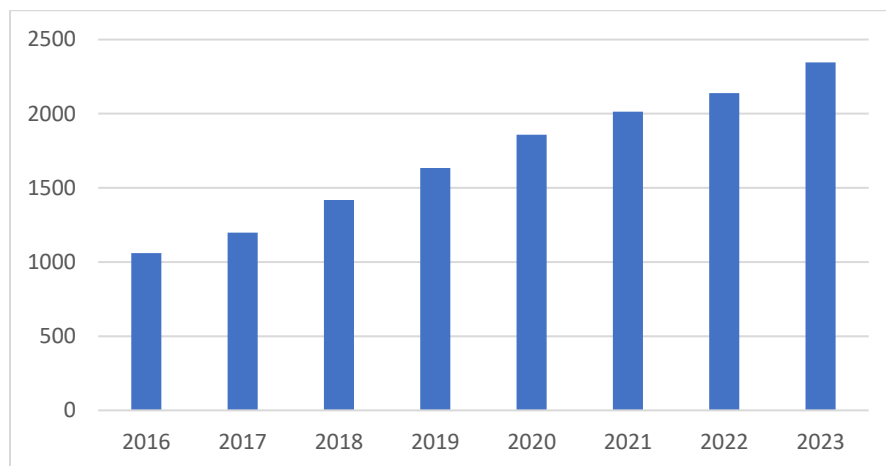
Zavod RS za transfuzijsko medicino (ZTM) je vse naštete dejavnosti razvijal iz preskrbe s krvjo, ki predstavlja prvo obliko celičnih terapij in iz katere izhaja vse potrebno znanje, infrastruktura in akreditacije. V Sloveniji je bilo zato uvajanje celičnih terapij enostavnejše in hitrejše kot ponekod v tujini, kjer so morali transplantacijski centri marsikatero dejavnost vzpostaviti na novo.

Presajanje KMC v Sloveniji se je začelo leta 1988, ko je bil izveden prvi avtologni odzem kostnega mozga. Ta se je nato na ZTM obdelal in zamrznil v tekočem dušiku. Postopki obdelave so bili sprva usmerjeni v volumsko redukcijo in odstranjevanje eritrocitov, kar je predpogoj za uspešno zamrzovanje. Kasneje se je vpeljal tehnološko zahtevnejši postopek imunomagnetne selekcije, sprva kot način zmanjšavanja neželenih učinkov po transplantaciji (deplecija limfocitov T), kasneje pa predvsem na področju regenerativne medicine (selekcija CD34+ in CD133+ celic). Sodobni postopki obdelave celičnih in tkivnih pripravkov in priprava zdravil za napredno zdravljenje se izvajajo v čistih prostorih in v avtomatiziranih postopkih v funkcionalno zaprtih sistemih.

Tehnologija zamrzovanja se je na ZTM sprva uporabljala za shranjevanje sveže plazme in eritrocitov. S presaditvami se je vzpostavil sistem zamrzovanja KMC s pomočjo krioprotektorja

DMSO in tekočega dušika. Pričela je delovati kriobanka, v kateri se shranjujejo različne celice in tkiva v kontroliranih pogojih s stalnim nadzorom in dostopnostjo 24/7. V njej se danes hranijo krvotvorne matične celice, popkovnična kri, dajalčevi limfociti, enojdrne celice za izdelavo naprednih zdravil, pripravki CAR-T, amnijska membrana, kostni režnji. Od leta 2017 do 2023 se je število shranjenih vrečk s pripravki KMC v kriobanki podvojilo. Poleg števila bolnikov na obseg shranjevanja vpliva tudi boljše preživetje, tandemske transplantacije, večje zahtevano število celic. Konec leta 2023 je bilo tako shranjenih skupaj 2347 vrečk, poleg tega pa še 1054 vrečk popkovnične krvi.

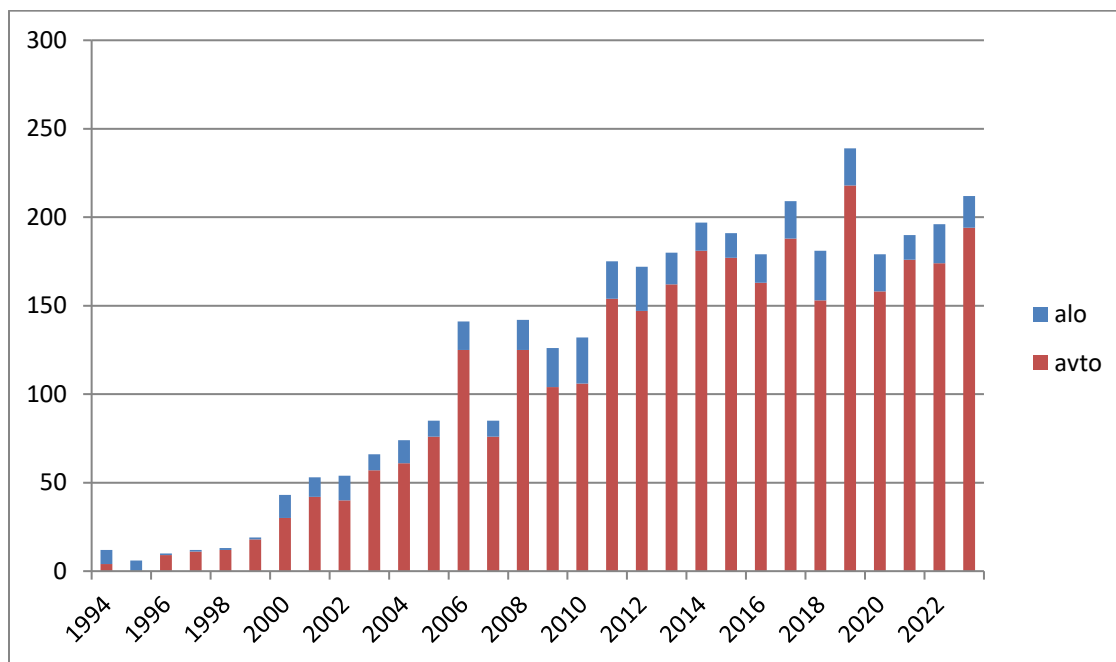
Postopki zamrzovanja in shranjevanja so se stalno izboljševali: s tehnologijo nadzorovanega zamrzovanja, uporabo DMSO in albumina kot zamrzovalnega medija, volumsko redukcijo pripravkov, dodatnimi kontrolami kakovosti kot so viabilnost in sterilnost, uporabo dvojnih vrečk oz. s shranjevanjem v parah tekočega dušika.



Slika 1: Število shranjenih vrečk pripravki KMC v kriobanki ZTM po letih

Posebno področje v transfuzijski medicini, ki je bilo deležno nenehnega razvoja, so bile afeze. Terapevtske afezeze so se izvajale na ZTM od leta 1980. Pridobljeno znanje, izkušnje in tehnologija so omogočili, da je bil v letu 1989 uspešno izveden prvi postopek zbiranja avtolognih KMC iz periferne krvi s postopkom afereze. Leta 1994 je bil izveden prvi aferezni postopek zbiranja KMC pri zdravem darovalcu. Tehnologija se je nenehno izpopolnjevala v smeri večje učinkovitosti in boljšega nadzora nad neželenimi pojavi. S širjenjem indikacij za transplantacijo in z vključevanjem tudi bolj rizičnih bolnikov, predvsem pa z vpeljavo aferez na področje pediatrije in regenerativne medicine, je bilo potrebno postopke ustrezno prilagajati:

individualna optimizacija parametrov zbiranja, predelava trojnega krvnega volumna, nadzor elektrolitov in kontinuirana infuzija kalcija, učinkovitejši žilni pristopi, spremljanje vitalnih znakov pri ogroženih pacientih in odvzemi na kliničnih oddelkih ob sodelovanju lečečih zdravnikov, intenzivistov, anesteziologov. Usklajen multidisciplinaren pristop in dobra priprava na vsak postopek je še zlasti pomembna pri pediatričnih bolnikih. Od leta 2015 se izvajajo aferezni odvzemi tudi pri otrocih s telesno težo pod 10 kg.



Slika 2: Število afereznih odvzemov KMC na ZTM po letih

Število afereznih odvzemov PKMC se je spreminjalo glede na število bolnikov, indikacije in ciljno število celic. V obdobju do konca 2023 je bilo opravljeno skupno 3.573 afereznih postopkov zbiranja KMC, od tega 13,7 % pri zdravih darovalcih. Največji delež so predstavljali odrasli hematološki pacienti (54,9 %). Poleg onkoloških in pediatričnih pacientov so pomemben delež predstavljali tudi kardiološki in urološki za področje regenerativne medicine (18,9 %).

Ustanovitev novega Oddelka za terapevtske storitve leta 2014 je združila dejavnosti preskrbe s celicami in tkivi, terapevtske postopke pri pacientih in izdelavo zdravil za napredno zdravljenje v eno organizacijsko enoto. Namen reorganizacije je bil večja učinkovitost dela, racionalizacija, pridobitev akreditacij in lažja koordinacija aktivnosti pri razvoju novih storitev. Delovanje oddelka je razvojno usmerjeno v področje transplantacij KMC, regenerativne medicine in imunoterapije.

Izvajanje dejavnosti temelji na sistemu kakovosti, za katerega je ZTM pridobil certifikat ISO 9001 v letu 2004. Na podlagi Zakona o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje, je bil ZTM leta 2008 s strani JAZMP imenovan za ustanovo za celice in tkiva in pridobil dovoljenje za opravljanje dejavnosti na področju preskrbe s krvotvornimi matičnimi celicami. Oddelek za terapevtske storitve je leta 2020 pridobil tudi akreditacijo Jacie (Joint Accreditation Committee – ISCT & EBMT) za področje procesiranja (obdelava, zamrzovanje in shranjevanje) in 2023 še za področje aferez. Prav tako ima Center za tipizacijo tkiv, v sklopu katerega deluje register Slovenija Donor, že od leta 2000 akreditacijo EFI (evropska federacija za imugenetiko).

V skladu z zahtevami Jacie standarda se uspešnost opravljenih postopkov analizira v letnih kvartalih. S korektivnimi ukrepi in spremljanjem njihove učinkovitosti se lahko zagotovi, da se raven storitev nenehno izboljšuje. Visoko strokoven kader, posvečeno osebje in izkušnje so nujni za ustrezno kakovost in varnost opravljenih storitev. Področje transfuzijske medicine s svojim

dolgoletnim znanjem in izkušnjami s podočja pridobivanja, predelave in hranjenja celic ima vzpostavljeno vso potrebno infrastrukturo, standarde, akreditacije, ki so potrebni, da s svojimi storitvami na področju presajanja krvotvornih matičnih celic prispeva svoj delež h končnemu uspehu te dejavnosti v slovenskem prostoru.

Bone Marrow Transplantation in Bosnia and Herzegovina

Đozo Aida

Blood Transfusion Institute of Federation of Bosnia and Herzegovina, Sarajevo

aida.djozo@zmfbih.ba

Abstract

First successful bone marrow transplant took place in 1963, using bone marrow from an identical twin. In the 1980s, autologous bone marrow transplants (using the patient's own bone marrow) were tested at several transplant centers. Analysis based on data reported to the European Society for Blood and Marrow Transplantation showed a continued increasing trend in the use of various types of Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Considering that the HSCT is very expensive treatment, it is not surprising that the access to treatment is not uniform across Europe. Bosnia and Herzegovina is a developing country and it is very challenging to achieve the highest standards in this field in the country. To present the activities in the field of Bone Marrow Transplantation in Bosnia and Herzegovina. Although small in size, Bosnia and Herzegovina has had an active history of Bone Marrow Transplantations. The first collection of HSCT was carried out at the end of 2003 and in the beginning of 2004 the first successful autologous transplant was carried out. We retrospectively analyzed the stem cell collection records of patients who underwent autologous transplantation from 2003 to 2023, with a break from 2007 to 2013. In total 428 procedures of autologous stem cell collection were performed for 301 patients. For 65% of patients only one procedure was performed and two or three procedures for 35% patients. Two-thirds of the procedures were performed in Sarajevo and one-third in Clinical Center Tuzla. Stem cell apheresis procedures also were performed on 6 children, where we had a special challenge with an 18-month-old child weighing 12 kilograms. A minimum number of CD34+ cells was collected in all patients, while in the majority of the patients the optimal number of CD34+

cells ($2.5 \times 10^6/\text{kg BW}$ - $3.5 \times 10^6/\text{kg BW}$). Viability and microbiological control results were in accordance with standards. It is evident that the Bone Marrow Transplantation in Bosnia and Herzegovina is not on the priority list of the healthcare government. Even though there is not "a big data", our success lies in the maintaining of continuity and in meeting a minimum of standards of quality. Our results of autologous HSCT does not differ from the experiences other collecting centers have arrived at. The results we provide are excellent compared to the economic and political milieu. The Blood Transfusion Institute of Federation of Bosnia and Herzegovina with its references serves as excellent basis for development of allogenic transplantation. However, the future progress in the field of Bone Marrow Transplantation in Bosnia and Herzegovina depends mainly on the government's commitment to achieving the highest standard in transfusion medicine.

Keywords: autologous hematopoietic stem cell transplantation, developing country, continuity, minimum standards, future perspective.

Introduction

Hematopoietic stem cell transplant (HSCT), sometimes referred to as bone marrow transplant, involves administering healthy hematopoietic stem cells to patients with dysfunctional or depleted bone marrow. First successful Bone Marrow Transplant took place in 1963, using bone marrow from an identical twin. In the 1980s, autologous bone marrow transplants (using the patient's own bone marrow) were tested at several transplant center. Analysis based on data reported to the European Society for Blood and Marrow Transplantation showed a continued increasing trend in the use of various types of Hematopoietic stem cell transplantation. In 2021, 47,412 HSCT (19,806 (42%) allogeneic and 27,606 (58%) autologous) in 43,109 patients were reported by 694 European centers.

Considering that the HSCT is a very expensive treatment, it is not surprising that the access to treatment is not uniform across the Europe. Bosnia and Herzegovina is an developing country

and it is very challenging to achieve the highest standards in this field in the country. Although small in size, Bosnia and Herzegovina has had an active history of bone marrow transplantations. Bone marrow transplantation started at the Institute for Blood Transfusion of Federation of Bosnia and Herzegovina in 2003, and in 2004 in Clinical Center Tuzla.

The complex structure and organization of the country is an essential problem in effectively establishing all aspects relevant for transplantation. There are defined competencies for health care and its organization that are performed at the level of entities and cantons. Blood Transfusion service in Bosnia and Herzegovina is partly a decentralized/fragmented and the blood donation is mainly hospital based with a small part performed by Red Cross or in association with hospital blood banks. There are two independent institutes in the country, in Sarajevo and Banja Luka. NAT testing is performed at two centers, Sarajevo and Mostar, the same as transplantation activities. The Blood donation system in Bosnia and Herzegovina is voluntary based in 100%, with strong component of regular voluntary donation, self-sufficient in one manner. During 2022 cca 100,000 blood units were collected.

In 1958, the first Blood Transfusion Service at Sarajevo was established. In 1963 first specialist physician became licensed in the transfusiology field in Bosnia and Herzegovina. In the 1970s and 1980s the Institute saw significant progress and the special effort was made on preparing the first Bone Marrow Transplantation. This steady development was brought to a halt by catastrophic war (1992 – 1995), that have decimated personnel, destroyed infrastructure, and demanded heroic efforts from transfusion services.

Legal framework

Bosnia and Herzegovina has a law regulating organ and tissue transplantation based on the legal framework that existed in the former state of Yugoslavia. In the Federation, laws on organ transplantation have been in place since 1997 with updates in 2004, 2009 and 2017, all aiming to improve the process. ("Rulebook on the detailed conditions of space, equipment and staff..in the healthcare institutions performing the function of tissue bank (2012). Rulebook on the procedure for collecting, storing and using peripheral blood stem cells (2012).

The first results

The first collection of Hematopoietic stem cell was carried out at the end of 2003 under the supervision of the colleagues from Slovenia. In the beginning of 2004, the first successful autologous transplant was carried out. The first results were encouraging, and they did not lag behind the results of other authors. They were a prerequisite for the independent performance of allogenic stem cell TX. However, health authorities have not done their role. A total of 11 transplantations were performed. All treated patients achieved complete hematologic reconstitution.

After a break of six years due to different reasons, there had been continued autologous stem cell transplantation project in Sarajevo. With a strong commitment to providing even more patients access to treatment.

Results 2003- 2023

In total 428 procedures of autologous stem cell collection were performed for 301 patients. For 65% of patients only one procedure was performed and two or three procedures for 35% patients. Stem cell apheresis procedures also were performed on 6 children, where we had a special challenge with an 18- month- old child weighing 12 kilograms. A minimum number of CD 34+cells was collected in all patients, while in the majority of the patients the optimal number of CD34+ cells ($2.5 \times 10^6/\text{kg BW}$ - $3.5 \times 10^6/\text{kg BW}$). Viability and microbiological control results were in accordance with standards.

Conclusions

Bosnia and Herzegovina is considered an transitional upper-middle-income country. The Bone Marrow Transplantation in Bosnia and Herzegovina is not on the priority list of the healthcare government. Over a 20-year period, we have conducted autologous hematopoietic stem cell transplantation making adaptations to the conventional procedures conducted in high-income countries. Even though there is no " big data ", our success lies in the maintaining of continuity and meeting a minimum of standards of quality. Autologous hematopoietic stem cell

transplantation can be conducted in low and middle -income country with reduced costs and similar efficacy, thus making this therapeutic option affordable for more persons. Our results do not differ from the experiences other collecting centers have arrived at. The results we provide are excellent compared to the economic and political milieu. The Blood Transfusion Institute of Federation of Bosnia and Herzegovina with its references serves as excellent basis for development of allogenic transplantation. The future progress in the field of Bone Marrow Transplantation in Bosnia and Herzegovina depends mainly on the government's commitment to achieving the highest standard in Transfusion medicine.

References

1. Snarski E, Great story of the first bone marrow transplants. Signals: Centre for Commercialization of Regenerative Medicine(CCRM), 2016. Available from: <http://www.signalsblog.ca/the-story-of-the-first-bone-marrow-transplant>.
2. Passweg J.R, Baldomero H, Ciceri F, Corbacioglu S, De la Camara R, et al. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapies in Europe 2021. The second year of the SARS-Cov-2 pandemic. A report from EBMT Activity Survey. March 2023. Bone Marrow Transplantation 58(6):1-12.
3. Sofo- Hafizovic A, Landzo E , Obralic N, Barbić- Fazlagic J, Rasic S, Dizdarevic A, Vila M , Ibricevic L. Our first experience with treatment of lymphoma using autologous transplantation in the first 100 day. HealthMED- Volume 3/Number 2/2009.
4. Mehic K, Ahmetovic- Karic G, Čatović- Baralija E, Arifović S. Ten- years experience of the ZTMFBIH transplantation team in collection of autologous hematopoietic stem cells- AHSC. 31st Annual Congress of the European Association of tissue and cell banks, 2023 Nov 22-24; Zagreb, Croatia; Book of abstracts. p. 106.
5. Balint Todorović M, Balint B, Đunić I, Smiljanić M, Mihaljević B. Employees organization/structure and functioning of the stem cell transplant center- how to optimise the transplant program? Medicinska reč. 2020; 1(3):109. <https://doi.org/10.5937/medrec2003109T>.

6. Ruiz-Argüelles GJ , Seber A, Ruiz-Delgado GJ. Conducting hematopoietic stem cell transplantation in low and middle income countries. July 2022. *Hematology* 27(1):809-812. Available from: <https://doi.org/10.1080/16078454.2022.2105513>.

Celične terapije (ZTMS)

Optimizacija afereznih postopkov za celične terapije

Ana Milojković

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šljajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

ana.milojkovic@ztm.si

Uvod: Celična imunoterapija je eno najhitreje razvijajočih se področij v terapiji raka. Vključuje že uveljavljene postopke zdravljenja, kot sta infuzija donorskih limfocitov (DLI-angl. Donor lymphocyte infusion) in zunajtelesna fototerapija (ECP-angl. Extracorporeal photopheresis), ter nove celične terapije kot je na primer terapija z modificiranimi celicami T z izraženim himernim receptorjem za tumorske antigene (angl. CAR-T), terapija z naravnimi celicami ubijalkami (angl. NK cells), virusno specifičnimi limfociti (VSL) ter tumorskimi vakcinami na osnovi dendritičnih celic.

Poleg izjemnega potenciala pri zdravljenju rakavih bolezni, celične terapije kažejo obetajoče se rezultate pri zdravljenju številnih drugih bolezni in stanj, kot so bolezni srca in ožilja, nevrodegenerativne bolezni, kronične vnetne avtoimunske bolezni, prirojene presnovne, mišično skeletne bolezni, kronične rane, opekline ter poškodbe.

Osnova za celične terapije so bolnikove lastne celice oziroma celice darovalca, ki se z zahtevnimi tehnološkimi postopki pripravljajo za vsakega bolnika posebej, kar vpliva na procese razvoja, izdelave ter stroške, ki so povezani s tem. Z vstopom komercialnih produktov na trg po odobritvi FDA (oktober 2017 Yescarta za relaps ali refr. DVCBL in Kymriah 2017 za B-ALL ter 2018 za DVBCL) se je pojavila potreba po standardizaciji začetnega biološkega materiala za celična zdravljenja. To predstavlja svojevrsten izziv zaradi izredne variabilnosti celične sestave afereznega produkta.

Po podatkih iz literature je pripravek mononuklearnih celic pridobljen iz periferne krvi bolnika oz darovalca začetni biološki material za večino navedenih terapij. Glede na dosedanje izkušnje

postaja vse bolj jasno, da odstopanja v afereznem produktu (zvišana variabilnost ali slabša kvaliteta celic) lahko bistveno vplivajo na uspešnost nadaljnje obdelave celic ter same terapije.

Na Zavodu za transfuzijsko medicino imamo več kot 40 let izkušenj s terapevtskimi aferezami. Začetki segajo v osemdeseta leta prejšnjega stoletja, ko smo začeli s postopki plazmaferez, hitro zatem so sledili prvi aferezni odvzemi krvotvornih matičnih celic (KMC) ter DLI, ki velja za najstarejšo obliko adoptivne celične imunoterapije. Čeprav omenjene izkušnje predstavljajo izjemen temelj za razumevanje ter izvajanje afereznih postopkov za nove celične terapije, principi samega odvzema niso enostavno prenosljivi.

Poleg klasičnih dejavnikov, ki vplivajo na uspešnost afereznega postopka kot so število ciljnih celic v krvi pred odvzemom, hitrost pretoka, predelani krvni volumen, žilni pristop, značilnosti celičnega ločevalca ter klinično stanje bolnika pred odvzemom, se pojavljajo tudi novi izzivi, specifični za zbiranje celic za napredne celične terapije. Posebnost je predvsem v tem, da bolniki oziroma darovalci niso mobilizirani. Če temu dodamo še dejavnik, da so bolniki običajno močno pretretirani s številnimi cikli KT in/ali radioterapije pridemo do tega, da je pri večini postopkov število levkocitov v periferni krvi bolnika izjemno nizko, kar otežuje formiranje levkocitno-trombocitne plasti (angl. buffy coat), ter vzdrževanje ustreznega nivoja zbiranja celic v centrifugi (angl. interface). Poleg tega aferezna tehnologija, ki temelji na diferencialnem centrifugiranju ne more selektivno ločiti mononuklearnih celic (MNC), ki imajo enako specifično gostoto.

Postopki zbiranja posameznih celičnih frakcij za potrebe celičnih terapij so relativno novi, strokovne literature ni veliko, tehnični ter klinični dejavniki, ki vplivajo na uspešnost zbiranja MNC celic iz periferne krvi še niso dovolj raziskani. Z namenom optimizacije in standardizacije postopkov je zato nujno potreben podroben vpogled v celoten proces zbiranja celic, začenši z indikacijo, pripravo bolnika, afereznega odvzema, priprave končnega pripravka ter infuzije celic.

V prispevku bomo pokazali posebnosti ter izzive pri afereznih postopkih za celične terapije, ki smo jih v desetletnem obdobju izvedli na CA OTS.

Metode: Retrospektivno smo analizirali podatke vseh MNC zbiranj za potrebe celičnih terapij, ki smo jih opravili na Centru za afereze(CA) od leta 2013 do konca leta 2023. Postopki so bili opravljeni na celičnih ločevalcih Cobe Spectra®, Spectra Optia (oba od proizvajalca Terumo BCT, Lakewood, CO, USA), Fenwal Amicus (Fresenius Kabi, Lake Zurich, IL), ali Therakos Cellex™(West Chester, PA, USA). Kot antikoagulant smo uporabljali ACD-a v razmerju 1:12. V večini primerov smo kot venski pristop uporabljali periferne kubitalne vene. V primeru da periferni pristop ni bil ustrezen, smo se odločili za osrednji venski kateter (OVK). Volumen pripravka ter število želenih/neželenih celic v pripravku sta bila prilagojena zahtevam naročnika. V primeru da naročnik ni podal specifičnih zahtev, smo sledili internim zahtevam kakovosti. Volumen predelane krvi je bil določen glede na interne zahteve kakovosti oz. prilagojen zahtevanemu številu celic z upoštevanjem začetnega števila celic v periferni krvi bolnika pred začetkom afereze. Spremljali smo vse neželene učinke, ki so se pojavili med, oziroma 24 ur, po končanem postopku.

Rezultati: Od leta 2013 do konca leta 2023, smo na CA OTS opravili skupno 10991 zbiranj s postopkom afereze. Od tega smo za potrebe celičnih terapij opravili 7051 aferez, kar znaša 64,15% vseh afereznih postopkov. Daleč največji delež predstavljajo odvzemi za ECP in sicer 6806 postopkov (96,5%). Zatem sledijo odvzemi pri kardioloških bolnikih in sicer 183 postopkov (2,3%). Preostanek (1,25%) pa so odvzemi za DLI (8 postopkov), CAR-T (23 postopkov) ter VSL (8 postopkov). Vsi izdani pripravki so zadoščali zahtevam kakovosti. Število neželenih učinkov je bilo zelo nizko, pojavljali so se pri 1% vseh postopkov.

Zaključek: Glede na desetletne izkušnje na CA lahko rečemo, da je zbiranje MNC za celične terapije varno in učinkovito. Vsekakor pa se moramo zavedati, da je aferezni produkt sestavljen iz živih celic ter da naravno prisotne variabilnosti ne bomo mogli nikoli v celoti izničiti. Po drugi strani pa za učinkovit in kvaliteten celični produkt moramo zadostiti visokim zahtevam kakovosti glede varnosti, čistosti, funkcionalnosti ter številu celic. Zato je izredno pomemben individualni pristop, sodelovanje vseh udeležениh, kritičen vpogled v delo ter ravnanje glede na najvišje standarde kakovosti, ker samo na ta način zagotavljamo uspešnost terapije, ki za določenega bolnika v danem trenutku nima alternative.

Literatura:

1. Ramos CA, Heslop HE, Brenner MK. CAR-T cell therapy for lymphoma. *Annu Rev Med* 2016; 67:165-83.
2. Newick K, O'Brien S, Moon E, et al. CAR-T cell therapy for solid tumors. *Annu Rev Med* 2017; 68:139-52.
3. Nair S, Dhodapkar MV. Natural killer T-cells in cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2017; 8:1178.
4. O'Reilly RJ, Prockop S, Hasan AN, et al. Virus specific T-cell banks for «off the shelf» adoptive therapy of refractory infections. *Bone Marrow Transplant* 2016; 51:1163-72.
5. Le Gall CM, Weiden J, Eggermont LJ, et al. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Nat Mater* 2018; 17: 474-5.
6. Kanold J, Merlin E, Halle P, Paillard C, Marabelle A, Rapatel C, et al. Photopheresis in pediatric graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation. clinical practice guidelines based on field experience and review of the literature. *Transfusion* 2007; 47:2276-89.
7. Strasser EF, Eckstein R: Optimisation of leukocyte collection and monocyte isolation for dendritic cell culture. *Transf Med Rev* 2010; 24:130-9.

Vpliv parametrov afereze na učinkovitost ločevanja – prikaz primera

Katja Petruša¹, Neva Kavčič²

1 Oddelek za terapevtske storitve, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

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

katja.petrusa@ztm.si

Uvod

Avtologna presaditev krvotvornih matičnih celic kljub številnim novim zdravilom ostaja eden ključnih načinov zdravljenja diseminiranega plazmocitoma. Zbiranje krvotvornih matičnih celic izvedemo s celičnim ločevalcem po predhodni mobilizaciji krvotvornih matičnih celic (KMC) v periferno kri. Mobilizacijo KMC dosežemo z granulocitne kolonije stimulirajočim faktorjem (G-CSF) v odmerku 10 mcg/kg telesne teže 4 do 5 dni pred predvidenim afereznim odvzemom, uporabo citostatikov, najpogosteje ciklofosfamida, v kombinaciji z G-CSF, v primeru nezadostne mobilizacije pa lahko na mobilizacijo dodatno vplivamo z uporabo plerixaforja - CXCR4 antagonist. Ob zadostni koncentraciji CD34+ celic v periferni krvi izvedemo zbiranje celic s celičnim ločevalcem, v katerem se celice med centrifugiranjem med seboj ločijo na osnovi specifične teže in/ali velikosti. Uspešnost zbiranja celic ocenimo z izračunom učinkovitosti zbiranja, in sicer po sledeči formuli: $CE2 = \frac{\text{Absolutno število CD34+ celic v produktu (x10}^6\text{)}}{\text{koncentracija CD34+ celic v krvi bolnika pred odvzemom (x10}^6\text{/L)}} \times \frac{\text{Celoten predelan krvni volumen (L)-volumen ACD-ja (L)}}{\text{volumen (L)}} \times 100$.

Predstavitve primera

67- letna pacientka z diseminiranim plazmocitomom IgG kapa je bila napotena na zbiranje krvotvornih matičnih celic zaradi predvidene avtologne presaditve KMC v sklopu zdravljenja osnovne bolezni.

Ob ugotovitvi bolezni je bila pri pacientki prisotna anemija, vrednost prostih lahkih verig kapa je bila 1500 mg/l, lambda 5,5 mg/l, M zobec 20 g/l, kreatinin in kalcij sta bila v mejah normale. Z biopsijo kostnega mozga je bila ugotovljena 80% infiltracija kostnega mozga s plazmocitomskimi celicami. FISH preiskava je pokazala hiperdiploidni kariotip in strukturne spremembe na kromosomu 1. Na rentgenu skeleta so bile ugotovljene osteolitične spremembe in zlom Th12 in L2. Pacientka je bila zdravljena po shemi bortezomib/ talidomid/ deksametazon (VTD), do zbiranja KMC je prejela 4 kroge zdravljenja, dosežen je bil dober delni odgovor. Med zdravljenjem je bila diagnosticirana atrijska fibrilacija zaradi česar je bil v terapijo uveden nizkomolekularni heparin. Drugih pridruženih bolezni pacientka ni imela.

Pri pacientki sta bili predvideni 2 avtologni presaditvi KMC, za vsako presaditev je bilo potrebno zbrati 3×10^6 CD34+ celic/kg telesne teže, skupno torej 6×10^6 CD34+ celic/kg telesne teže. Po predhodni mobilizaciji KMC v periferno kri z G-CSF v odmerku 10 mcg/kg telesne teže, je imela 4. dan pacientka v krvi zadostno število CD34+ celic za začetek afereznega postopka. Zbiranje KMC smo izvedli s celičnim ločevalcem Amicus proizvajalca Fresenius Kabi, postopek je potekal brez posebnosti. Kljub zadovoljivemu izhodiščnemu številu CD34+ celic je bila učinkovitost zbiranja presenetljivo zelo nizka. Naslednji dan smo ponovili zbiranje KMC, pred tem je pacientka prejela transfuzijo koncentriranih eritrocitov za korekcijo mikrocitne anemije. Zbiranje smo opravili z istim celičnim ločevalcem, učinkovitost zbiranja je bila ponovno zelo nizka. Zaradi relativno nizke izhodiščne vrednosti CD34+ celic v periferni krvi in nizke učinkovitosti zbiranja smo odvzem drugi dan predčasno zaključili. Sprejeta je bila odločitev, da bo potrebno ponovno zbirati KMC po predhodni stimulaciji s ciklofosfamidom in G-CSF. Približno mesec dni kasneje se je pacientka ponovno zglasila za zbiranje KMC, ki smo ga tokrat izvedli z drugim celičnim ločevalcem, Spectra Optio proizvajalca Terumo BCT. Kljub visokemu odstotku ter koncentraciji CD34+ celic in ustreznim potekom afereze, je bila učinkovitost zbiranja ponovno zelo nizka. Zaradi ponavljajoče slabe učinkovitosti zbiranja smo analizirali razpoložljive podatke in ugotovili pomembne spremembe v rdeči krvni sliki (hipokromni mikrocitni eritrociti), ki bi lahko vplivale na ločevanje celic v centrifugalnem polju. Ob 4. zbiranju smo zato z namenom višje učinkovitosti zbiranja povišali t.i. »packing factor«, ki predstavlja razmerje med pretokom vhodne črpalke in hitrostjo

centrifugiranja in hitrost zbiralne črpalke ter tako zbrali zadovoljivo število CD34+ celic. Večer pred 5. zbiranjem je pacientka za zagotovitev čim višje izhodiščne vrednosti CD34+ celic pred afereznim odvzemom prejela plerixafor. Zaradi pričakovanih izgub trombocitov ob spremenjenih nastavitvah celičnega ločevalca je pred zbiranjem prejela transfuzijo 2 enot trombocitov. Podatki o posameznih odvzemih in zbranih pripravkih so zbrani v Tabeli 1.

Pacientka je imela mesec dni po zbiranju prvo in do sedaj edino presaditev KMC. Do regeneracije kostnega mozga je prišlo v zadovoljivem času, in sicer 17. dan po presaditvi (nevtrofilni granulociti $1 \times 10^9/L$, trombociti $25 \times 10^9/L$). Med hospitalizacijo, v obdobju aplazije po presaditvi, je pacientka zakrvavela iz spodnjih prebavil. S slikovnimi in endoskopskimi preiskavami je bilo ugotovljeno, da pacientka krvavi iz angiodisplazij, ki so bile sklerozirane, vstavljenih je bilo več hemostatskih klipov. Ob omenjenih ukrepih in porastu trombocitov je krvavitev prenehala. Pacientka po presaditvi redno opravlja specialistične preglede v področni hematološki ambulanti. 7 mesecev po presaditvi je bila pri pacientki zaradi citopenij narejena biopsija kostnega mozga, takrat opisane histološke spremembe so nakazovale možnost obstoja mielodisplastičnega sindroma, vendar se je kasneje krvna slika spontano izboljšala. Ob zadnjem pregledu (približno 2 leti po presaditvi KMC), je bila krvna slika normalna, diseminirani plazmocitom v remisiji.

Razpravljanje

Na učinkovitost zbiranja KMC z afereznim postopkom vplivajo številni dejavniki kot so značilnosti darovalca, vrsta in nastavitve celičnega ločevalca. Izhodiščna vrednost CD34+ celic ostaja najbolj zanesljiv napovedni dejavnik za zbrano število CD34+ celic. Kljub uspešni mobilizaciji KMC in ustrezno izpeljanemu afereznemu odvzemu pa se lahko srečamo z nepričakovano nizko učinkovitostjo zbiranja, kot se je zgodilo v prikazanem primeru. Po analizi vseh razpoložljivih podatkov in pregledu literature je nepričakovano nizki učinkovitosti zbiranja CD34+ celic najverjetneje botrovala prisotnost hipokromnih mikrocitnih eritrocitov v periferni krvi, ki so pomembno vplivali na ločevanje trombocitno-levkocitne plasti in s tem na učinkovitost zbiranja. Mehanizem spremenjenega ločevanja celic je najverjetneje dvojen, in sicer so hipokromni mikrocitni eritrociti lažji od enojedrnih celic, kjer se nahajajo krvotvorne matične celice in se

posledično le-te nahajajo nižje kot običajno, prav tako pa je razmejitev med posameznimi vrstami celic slabša. S povišanjem t.i. »packing faktorja«, ki predstavlja razmerje med hitrostjo vhodne črpalke in centrifugiranja, kar vpliva na večjo zgoščenost celic v centrifugalnem polju ter povišanim pretokom zbiralne črpalke, smo dosegli pomembno višjo učinkovitost zbiranja. Dobro sodelovanje z lečečo hematologinjo, ustrezna priprava pacientke na odvzem in prilagoditev postopka zbiranja CD34+ celic so bili ključni za zadostno zbrano število CD34+ celic, kar je pogoj za uspešno avtologno presaditev krvotvornih matičnih celic.

Literatura

1. Constantinou CV, Bouinta A, Karponi G, Zervou F, Papayanni P, Stamatoyannopoulos G, et al. Poor stem cell harvest may not always be related to poor mobilization: lessons gained from a mobilization study in beta-thalassemia major patients. *Transfusion*. 2017; 57(4):1031-39.
2. Maitta R, Current state of apheresis technology and its applications. *Transfus Apher Sci*. 2018; 57(5):606-613.
3. Wang TF, Chen SH, Yang SH, Su JC, Chu SC, Li DK. Poor harvest of peripheral blood stem cell in donors with microcytic red blood cells. *Transfusion*. 2013; 53(1):91-5.
4. Sanford K, Roseff SD, Anderson J, Chung HM, McPherson RA. Harvesting autologous stem cells from a patient with red blood cell abnormalities of β -thalassemia intermedia. *Transfusion* 2014; 54:1881-86.
5. Tiwari AK, Pandey P, Subbaraman H, Bharhava R, Rawat G, Madiraju S, et.al. Autologous peripheral blood stem cell harvest: Collection efficiency and factors affecting it. *Asian J Transfus Sci* 2016;10:93-7.

Žilni pristopi pri afereznih postopkih

Katja Berk Lahajner, Ana Milojković,

Zavod RS za transfuzijsko medicino

katja_berk-lahajner@ztm.si

Na Oddelku za terapevtske storitve Zavoda RS za transfuzijsko medicino izvajamo aferezne postopke v različne terapevtske namene. Številčno jih največ pripada postopkom zunajtelesne fotofereze (ECP-extracorporeal photopheresis), sledijo avtologni odvzemi krvotvornih matičnih celic (KMC), granulofereze, alogenski sorodni odvzemi KMC, alogenski nesorodni odvzemi KMC ter limfofereze (DLI – donor lymphocyte infusion), terapevtske trombofereze, terapevtske levkofereze, v zadnjem času pa tudi vse več limfoferez za namene zdravljenja z naprednimi celičnimi terapijami (CAR-T).

Splošni princip afereznega postopka je ločevanje komponent krvi s pomočjo celičnega ločevalca, njihovo zbiranje in selektivno vračanje v krvni obtok pacienta. Za tak postopek potrebujemo ustrezen žilni pristop, ki je glede na tip postopka lahko eno ali dvožilni. Na izbiro žilnega pristopa vpliva več faktorjev: venska anatomija pacienta, vrsta postopka in zahtevane hitrosti pretokov, predvideno število/čas trajanja, stopnja nujnosti ter nenazadnje dostopnost izkušenega osebja za vzpostavljanje ustrezne venske poti.

Glede na lokacijo katetra delimo žilne pristope na periferne in centralne, razlika med njimi je predvsem v indikacijah, tehnikah vstavljanja ter možnih zapletih, pri čemer so centralni katetri bistveno invazivnejša različica.

Svetovna konferenca za žilne pristope (WoCoVa) je z namenom poenotenja in standardizacije podala smernice o uporabi perifernih venskih dostopov, ki vključujejo klasifikacijo, indikacije, tehnike vstavljanja ter njihovo vzdrževanje, preprečevanje in zdravljenje zapletov ter odstranjevanje. **Periferni venski katetri** (PVAD – peripheral venous access device) so tisti, katerih konica ne sega v zgornjo ali spodnjo veno cavo oziroma desni atrij. Delimo jih na kratke periferne

(SPC) dolžine < 6cm, dolge periferne (LPC) dolžine 6-15cm ter »midline« (midclavicular, MC) dolžine > 15cm. Indikacije za njihovo vstavitve so med drugim tudi aferezni postopki, glede na predviden čas trajanja/število postopkov so SPC primerni za nujne primere in lahko ostanejo in situ do 48h, integrirani SPC 2-7 dni, LPC 1-4 tedne ter MC > 4 tedne. Mesto vstavitve so povrhnje vene podlahti (v.basilica, v.cephalica) oziroma globoke vene (v.brachialis).

Centralni venski katetri (CVAD – central venous access device) so po osnovni definiciji tisti, katerih konica sega v zgornjo ali spodnjo veno cavo oz. v desni atrij (izjema je femoralni katerega konica je v v.femoralis). Delimo jih na *ne-tunelirane* (t.j.začasne), *tunelirane*, *implantirane* (IVAD) – porte ter *periferno vstavljene centralne* – PICC katetre, ki zaradi premajhnih lumnov in posledično prenzkih pretokov niso primerni za aferezne postopke kot izhodna linija. Za kratkoročno aferezno uporabo so primerni ne-tunelirani, in sicer dvolumenski dializni katetri, ki nudijo zadosten pretok, v primeru potrebe po ponavljajočih se afereznih postopkih pa bi prišli v poštev aferezni porti, ki se od klasičnih (50-60ml/min) razlikujejo predvsem po večjih pretokih (120-150ml/min) ter 30° pristopu relativno na površino kože. Zaradi številnih zapletov, ki spremljajo centralne venske katetre (infekcije, tromboze, mehanski zapleti, stenoze, zapleti ob vstavitvi-pnevmotoraks, hematotoraks, arterijska punkcija, aritmije) in imajo velik vpliv na morbiditeto in mortaliteto ter stroške zdravljenja, so za aferezne postopke vedno prva izbira periferni venski dostopi.

Temu v prid govori tudi statistična analiza uporabljenih žilnih pristopov v našem afereznem centru v obdobju zadnjih petih let (2019-2023), na katero se v nadaljevanju nanašajo odstotkovne primerjave. Glede na število opravljenih postopkov se bomo osredotočili na dve najpogostjši vrsti aferez: zbiranje krvotvornih matičnih celic in postopek zunajtelesne fotofereze.

Zbiranje krvotvornih matičnih celic (KMC) z afereznim postopkom bodisi za avtologno (87-92% vseh postopkov), bodisi za alogensko presaditev (8-13% vseh postopkov) poteka s centrifugiranjem in ločevanjem krvnih komponent na osnovi specifične teže plazme in celic. Za žilni dostop sta potrebni izhodno in vhodno mesto. V našem centru je bil v 80-92% uporabljen periferni žilni pristop, v 8-18% centralni venski pristop (večinoma dvolumenski dializni kateter) ter v 0,5-3% kombinacija obojega. Zaradi konstantnega pretoka krvi od pacienta v celični ločevalec je

izjemno pomembno, da izhodno mesto žilnega dostopa zdrži negativen tlak, ki pri tem nastaja. Ker je zbiranje KMC povezano z največ tremi zaporednimi postopki in ne gre za dolgotrajno terapijo, je prva izbira vedno periferni dostop, razen v primeru kontraindikacij (slabo stanje perifernih ven ali starost oz. psihično stanje pacienta, ki onemogoča konstanten večurni nespremenjen položaj roke med postopkom, npr. pri pediatričnih pacientih).

Zunajtelesna fotofereza je kombinacija afereze in fotodinamične terapije z namenom imunomodulacije pri zdravljenju kožnega T-celičnega limfoma (CTCL), GvHD (graft-versus-host disease), zavrnitvene reakcije po transplantaciji solidnega organa, sistemske skleroze, Chronove bolezni in nekaterih drugih. Postopek je sestavljen iz treh zaporednih faz: zbiranje buffy coata, fotoinaktivacije z UV-A svetlobo ter vračanja inaktiviranih celic, ki imajo imunomodulatorene učinek. ECP lahko izvedemo kot »*in-line*« postopek, kar pomeni, da potekajo vse tri faze znotraj enega aparata (Therakos®) in sicer na dva načina, od katerih je tudi odvisno, ali potrebujemo eden ali dva žilna dostopa: pri intermitentnem postopku poteka afereza in vračanje skozi isti venski kanal, pri kontinuiranem postopku pa potrebujemo ločen aferezni izhodni kanal in vhodni kanal za vračanje. Prednost slednjega je manjši zunajtelesni volumen, kar omogoča varnejšo obravnavo pacientov z nižjo telesno težo in nagnjenostjo k hemodinamski nestabilnosti. Dvožilni, kontinuiran postopek je hitrejši, kljub vsemu pa Therakos Cellex omogoča kombinacijo kontinuiranega (dvožilnega) in intermitentnega (enožilnega) postopka, kar je še posebej dobrodošlo v primeru disfunkcije enega od žilnih dostopov ter dokončanje postopka skozi en delujoč žilni dostop. Pri »*off-line*« postopku izvedemo vse tri faze ločeno: zbiranje buffy coata (Amicus® ali Optia®), fotoinaktivacija na ločenem aparatu ter reinfuzija pripravka. Tretja možnost je t.i. *mini-ECP*, kjer zaradi kliničnega stanja pacienta ali neustreznosti perifernih ven afereznega postopka ni možno izpeljati strojno. V tem primeru se pripravi odvzem 300-350ml (oz. prilagojeno teži bolnika pri pediatrični populaciji) polne krvi bodisi z enkratno venepunkcijo bodisi iz obstoječega CVAD, ki ga ima pacient za druge terapevtske namene, obdela s fotoinaktivacijo ter reinfundira pacientu. ECP kot terapija predstavlja številčno in časovno obsežne postopke, zato je tudi v smislu žilnih pristopov eden največjih izzivov afereznega tima. Zaradi osnovnih diagnoz oz. pridruženih bolezni, stanja po kemoterapijah, terapijah s sistemskimi kortikosteroidi, kožnih sprememb, nagnjenosti h

krvavitvam, infektov, hemodinamske nestabilnosti in številnih venepunkcij imajo tovrstni pacienti večinoma slabo dostopnost in kvaliteto perifernih ven. Kljub naštetemu pa tudi za ECP ostaja periferni venski dostop prva izbira. V letih 2019- 2023 smo v našem centru izvedli 4261 postopkov ECP pri čemer je bil v 88% uporabljen periferni žilni dostop, v 10% centralni in v 2% kombinacija obeh. Kot alternativna možnost za predvideno dolgotrajnejšo uporabo so tunelirani CVAD, ki so večinoma dvolumenski, poliuretanski ali silikonski, običajno vstopno mesto je desna v.jugularis interna, s podkožnim žepom na desni strani prsnega koša. Zadnja leta se pojavljajo tudi subkutani aferezni porti, ki za razliko od klasičnih omogočajo večje pretoke (120-150 ml/min), je pa njihova vstavitev kompleksnejša od običajnih CVAD.

Izbira žilnega pristopa je glede na pacienta individualna, upoštevajoč vrsto afereznega postopka in tehnične zahteve aparata, predvideno trajanje, stanje perifernih ven, (ne)pokretnost pacienta ter vpliv morebitnih zapletov na izid zdravljenja ob dolgotrajno vstavljenih katetrih. Nenazadnje je potrebno upoštevati tudi kvaliteto življenja pacienta ob dodatni skrbi za dolgotrajen venski dostop ter spremljajočih omejitvah v vsakdanjem življenju.

Literatura:

1. Ipe TS, Marques MB. Vascular access for therapeutic plasma exchange. *Transfusion*. 2018 Feb;58(58):580–9.
2. Adamski J. Vascular access considerations for extracorporeal photopheresis. *Transfusion*. 2018 Feb;58(58):590–7.
3. Pittiruti M, Van Boxtel T, Scoppettuolo G, Carr P, Konstantinou E, Ortiz Miluy G, et al. European recommendations on the proper indication and use of peripheral venous access devices (the ERPIUP consensus): A WoCoVA project. *The Journal of Vascular Access*. 2021 Jun 4;112972982110232.
4. Kalantari K. The choice of vascular access for therapeutic apheresis. *Journal of Clinical Apheresis*. 2012;27(3):153–9.
5. Barth D, Sanchez A, Thomsen A, Garcia A, Malachowski R, Weldon R, et al. Peripheral vascular access for therapeutic plasma exchange: A practical approach to increased utilization and selecting the most appropriate vascular access. *Journal of Clinical Apheresis*. 2020 Mar 19;35(3):178–87.

Virusno specifični limfociti T: nove indikacije, nove možnosti

Primož Požnel

Zavod RS za transfuzijsko medicino

Primoz.poznel@ ztm.si

Uvod

Prvo zdravljenje z adoptivnim prenosom virusno specifičnih limfocitov T (VSL) so izvedli že leta 1995. Najprej so jih uspešno uporabljali za zdravljenje rezistentnih virusnih okužb po transplantaciji krvotvornih matičnih celic (KMC). Celična imunost je pri prejemniku alogenskih KMC lahko prizadeta več mesecev. V tem obdobju je močno povečano tveganje za pojav ogrožujočih virusnih okužb.

V zadnjih letih poskušajo z VSL zdraviti virusne okužbe tudi pri drugih imunsko prizadetih bolnikih (transplantacija solidnih organov, prirojene imunske pomanjkljivost in virusno pogojeni malignomi).

VSL lahko pridobivamo z ex vivo ekspanzijo ali neposredno z imunoselekcijo reaktivnih limfocitov (CCS – angl. Cytokine Capture System). Pristop s CCS je novejši in omogoča precej hitrejše pridobivanje celic za zdravljenje, kar je precejšnja prednost pred ex vivo ekspanzijo, saj je hiter odziv na neugodno okužbo ključnega pomena. Prednost prve pa je v večjem številu pridobljenih celic in v tem, da je mogoče poljubno modilirati število in specifičnost virusnih peptidov, proti katerim pripravljamo limfocite T.

Uporaba VSL po alogenski transplantaciji KMC

Celična imunost je po alogenski transplantaciji KMC močno okvarjena in potrebuje veliko časa, da se v popolnosti regenerira. V tem času je bolnik med drugim izpostavljen reaktivacijam ali de novo virusnim okužbam. Najpogostejše so reaktivacije latentnih okužb s CMV in EBV ter nove okužbe z adenovirusom. Protivirusno zdravljenje adenovirusa in CMV temelji na zdravilih cidofovir,

foskarnet, ganciklovir in letermovir , ki pa so pogosto neučinkovita ali pa imajo hude stranske učinke. V preteklosti so za hitrejšo regeneracijo celične imunosti uporabljali donorske limfocite, ki so bili pri tem učinkoviti, vendar so znatno zvišali tveganje za pojav GVHD (angl. Graft versus Host disease). VSL so se izkazali pri zdravljenju potransplantacijske limfoproliferativne bolezni zaradi okužbe z EBV. V različnih kliničnih študijah so dosegli odziv na zdravljenje v približno 70%. Podobna učinkovitost se je pokazala tudi pri zdravljenju okužb s CMV.

Tveganje pri uporabi VSL je aloreaktivnost oziroma nevarnost GVHD. Dosedanje klinične študije so pokazale, da je pri omejitvi odmerka aloreaktivnih celic T GVHD višjih stopenj (III in IV) ter kroničnih oblik malo. Vprašanje preventivnega dajanja VSL v času pred transplantacijo ostaja odprto.

VSL so se do sedaj izkazali kot obetavna celična terapija za zdravljenje rezistentnih okužb s CMV in EBV v obdobju po alogenski transplantaciji KMC.

VSL za progresivno multifokalno levkoencefalopatijo (PML)

Progresivna levkoencefalopatija nastane zaradi oportunistične okužbe možganov s poliomavirusom 2 –virusom JC (JCV). Gre za nevarno okužbo možganov, ki se praviloma pojavlja pri dolgotrajni imunski supresiji (krvne bolezni , transplantacija KMC, okužba s HIV, prirojena imunska pomanjkljivost in zdravljenje z monoklonskimi protitelesi), ima visoko smrtnost ter hudo breme nevrološke prizadetosti. Učinkovito protivirusno zdravilo za to bolezen ni na voljo, zato je edina možnost ponovna vzpostavitev specifične protivirusne celične imunosti pri bolniku. Incidenca PML raste zaradi vse večje uporabe monoklonskih protiteles in imunskih modulatorjev pri krvnih in avtoimunskih boleznih.

Obstajata dva pristopa. Pri avtolognem bolnikove lastne limfocite T najprej gojijo in nato stimulirajo ex vivo z virusnimi peptidi. S tem pridobijo večje število limfocitov T, ki so specifični za virus JC. Lahko uporabijo tudi periferne mononuklearne celice sorodnih ali nesorodnih darovalcev, ki so skladni (darovalci KMC), haplo-skladni ali delno skladni v sistemu HLA. Predpogoj je, da izkazujejo imunost proti virusu JC (dokaz specifičnih protiteles ali reaktivnih limfocitov T v

periferni krvi). Metoda ex vivo je časovno zamudna, saj traja 3-4 tedne. Pri bolniku, ki ima hitro napredujoč potek PML, je to lahko zelo dolga doba.

Drugi pristop vključuje levkaferezni odvzem mononuklearnih celic, njihovo stimulacijo s komercialno pripravljenimi virusnimi peptidi (t.i. peptivator) ter imunomagnetno selekcijo reaktivnih celic. Pri tem pristopu je potrebno nadzirati in po potrebi omejiti število aloreaktivnih limfocitov T, da zmanjšamo tveganje za GVHD. Pripravo VSL na ta način zapleta njihova nizka frekvenca v periferni krvi darovalcev.

Med virusoma BK in JC obstaja velika podobnost v imunodominantnih antigenih (kapsidni protein VP-1 in large T antigen), zato so v nekaterih novejših kliničnih študijah uporabili za zdravljenje PML VSL, specifične za virus BK.

Pristopi glede izbire donorjev ali načina proizvodnje so različni. Kljub temu, da je število do sedaj zdravljenih bolnikov nizko, gre za perspektivno celično terapijo z dobrim kliničnim učinkom, ki ima velik potencial, da zmanjša smrtnost in nevrološko prizadetost pri PML. Izkazalo se je, da je priprava VSL za PML izvedljiva, infuzija celic je varna, limfociti T se obdržijo v krvi bolnika dlje časa in nudijo celično imunost proti virusu JC.

VSL proti SARSCov2

Motnje celične imunosti proti SARS-CoV2 povezujejo s povečanim tveganjem za hujši potek COVID-19, dolgotrajnim sproščanjem virusa in pojavom bolj virulentnih različic. Posebej so ogroženi bolniki po transplantaciji KMC. Dobre izkušnje z zdravljenjem virusnih okužb (predvsem CMV in EBV) v tej populaciji bolnikov so tlakovale pot številnim poskusom zdravljenja COVID-19 z VSL od začetka epidemije leta 2020 do danes.

Podobno kot pri ostalih pristopih zdravljenja potransplantacijskih virusnih okužb sta tudi tukaj možna dva glavna načina pridobivanja VSL, ki smo ju že omenili zgoraj. Časovno in tudi finančno bolj zahtevna je ex vivo ekspanzija donorjevih limfocitov T, pri čemer le-te izpostavijo širšemu naboru virusnih peptidov SARSCov2 (pridobljeni iz strukturnih in ne-strukturnih beljakovin), ki jih

v gojišču predstavljajo antigen predstavitvene celice. Po 16 dneh gojenja pridobijo VSL, ki so usmerjeni proti mnogim različnim peptidom SARSCoV2.

Drug obetaven pristop je vezan na aparat Prodigy, ki omogoča neposredno magnetno imunoselekcijo reaktivnih limfocitov, ki so sposobni prepoznati komercialno pripravljene peptide virusa SARSCoV2.

VSL proti SARSCoV2 so zaenkrat uporabili v manjših nekontroliranih študijah ali za posamezne bolnike. Klinični odziv po infuziji VSL so dosegli v več kot 50% primerov, kar je primerljivo s predhodnimi rezultati zdravljenja okužb s CMV in EBV. Resnih stranskih učinkov niso opažali. GVHD je bil praviloma posledica izboljšane delovanja presadka KMC potem, ko so izvedli infuzijo VSL.

Diskusija in zaključek

Alogenski virusno specifični limfociti so v zadnjih letih z razvojem avtomatiziranih metod pridobivanja (npr. CCS, Miltenyi Prodigy) postali bolj mnogo bolj dostopni kot so bili v času prevladujočih metod ex vivo ekspanzije. Postopek CCS traja največ 12-24 ur in zagotavlja zadostno število virusno specifičnih limfocitov T za zdravljenje virusnih okužb. Ker se celice T po stimulaciji z virusnimi antigeni v bolniku intenzivno pomnožujejo, je klinično učinkovit tudi manjši odmerek celic. Klinične študije praviloma ne kažejo od odmerka celic T odvisnega odgovora. Zdravljenje je sorazmerno varno, saj se hudi neželeni učinki (GVHD stopnje III in IV) pojavljajo redko.

V zadnjem času intenzivno preizkušajo nove možnosti zdravljenja okužb z virusoma BK in JC pri imunosuprimiranih bolnikih po alogenski transplantaciji KMC ali po transplantaciji solidnega organa. Zaradi uničujoče epidemije COVID-19 so v teku številne študije adoptivnega prenosa VSL proti SARSCoV2. Rezultati zgodnjih študij so zelo obetavni.

Kljub pozitivnim rezultatom moramo biti pri interpretaciji rezultatov zdravljenja z VSL previdni. Večina podatkov prihaja iz manjših, nekontroliranih študij. V pilotnih študijah in manjših serijah VSL kažejo 60-80% učinkovitost. Pristop CCS omogoča dostop do zdravljenja tudi bolnikom iz

okolij, kjer nimajo razvitih zahtevnih postopkov za ex vivo ekspanzijo limfocitov T. Vsekakor gre za obetavno celično terapijo, ki se bo v prihodnosti še razvijala.

Literatura:

1. Heinz AT, Calkoen FGJ, Derbich A et al. Automated production of specific T cells for treatment of refractory viral infections after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2023 Aug 1; 108(8): 2080-2090.
2. Cortese I, Beck ES, Al-Louzi O et al. BK virus-specific T cells for immunotherapy of progressive multifocal leukoencephalopathy: an open-label, single-cohort pilot study *Lancet Neurol* 2021; 20: 639–52.
3. Quach DH, Lulla P, Rooney CM. Banking on virus-specific T cells to fulfill the need for off-the-shelf cell therapies. [Blood](#). 2023 Feb 23; 141(8): 877–885.
4. Möhn N, Grote-Levi L, Hopfner F et al. Innovative therapeutic concepts of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurol*. 2022 May;269(5):2403-2413.
5. László Gopcsa, Marienn Réti, Hajnalka Andrikovics. Effective virus-specific T-cell therapy for high-risk SARS-CoV-2 infections in hematopoietic stem cell transplant recipients: initial case studies and literature review, *GeroScience* (2024) 46:1083–1106.
6. Green A, Rubinstein JD, Grimley M et al. Virus-Specific T cells for the treatment of systemic infections following allogeneic hematopoietic cell and solid organ transplantation. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* 2024;13(S1):S49–S57.

Zdravljenje pediatrične bolnice s CMV/adeno/sarCov2 virusno specifičnimi limfociti - prikaz primera

Simona Ivančan

Klinični oddelek za hematologijo in onkologijo Pediatrične klinike, UKC Ljubljana

simona.avcin@kclj.si

Uvod

Alogenska presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC) je postala standard zdravljenja številnih malignih in nemalignih obolenj. Kljub napredku je postopek zapleten, z visokim deležem obolevnosti in umrljivosti. V obdobju imunske rekonstitucije po PKMC, so virusne reaktivacije, ki so praviloma na zdravljenje slabo odzivne, glavni vzrok obolevnosti in umrljivosti. Razlog je oslabljen imunski sistem prejemnika, ki ni sposoben omejiti replikacije in širjenja virusa.

Virusne reaktivacije se pretežno razvijejo v prvih 6 mesecih po PKMC. Najpogostejši virusi, ki se reaktivirajo, so citomegalovirus (CMV), virus Epstein-Barr (EBV), virus BK (BKV), adenovirus (AdV) in humani herpesvirus 6 (HHV-6). V obdobju po 2019, po izbruhu virusa SARS-CoV-2, je postala tudi bolezen COVID-19 pomemben dejavnik tveganja za peri- in posttransplantacijsko obolevnost in umrljivost.

Razpoložljivi standardni preventivni protivirusni protokoli ali prve linije protivirusnega zdravljenja imajo pogosto slabo učinkovitost in precejšnjo toksičnost. Poleg tega se lahko tekom zdravljenja razvije odpornost na zdravilo, in najpomembneje, ne nudijo dolgotrajne zaščite pred okužbo in imunološkega spomina.

T-celična rekonstitucija je bistvena za učinkovit nadzor okužbe po PKMC glede na osrednjo vlogo za patogen specifičnih celic T pri nadzoru okužb. Ukrepi za hitrejšo imunsko rekonstitucijo, ki je antigensko specifična za patogene, obenem s celično imunostjo uspešno dopolnijo ali celo nadomestijo razpoložljive profilaktične in terapevtske režime.

Adoptivna imunoterapija, ki je specifična za antigen, lahko selektivno prepozna in odstrani gostiteljske celice s prepoznavanjem teh antigenov. Aplikacija antigen-specifičnih efektorskih imunskih celic je bila uspešno uporabljena tudi za oportunistične sistemske virusne reaktivacije po PKMC.

Virusno specifične limfocite T je mogoče pridobiti od seropozitivnih alogenskih darovalcev (npr. CMV seropozitivnih posameznikov) in jih nato infundirati prejemniku PKMC z namenom ponovne vzpostavitve protivirusne imunosti, ki je bistveno hitrejša od naravnega poteka rekonstitucije celic T po PKMC. Na voljo imamo več strategij za izolacijo in manipulacijo virusno specifičnih limfocitov za zdravljenje bolnikov po PKMC. Dodamo naj še, da imunsko rekonstitucijo po PKMC podaljšujejo še ostali specifični zapleti, ki se lahko pojavijo, kot so bolezen presadka proti gostitelju (GVHD), zavrnitev ali oslABLJENO delovanje presadka, prisotnost več oportunističnih okužb hkrati ali kronična disfunkcija katerega od organskih sistemov.

Poudarimo naj, da virusno specifični limfociti v pediatrični populaciji niso prva linija zdravljenja virusnih reaktivacij, ampak se uporabljajo za dodatno zdravljenje po nezadostnem učinku zdravljenja prvega reda, ki so po standardni obravnavi virostatiki in specifični protivirusni imunoglobulini.

Prikaz kliničnega primera

Opisali bomo primer mladostnice z akutno mieloično levkemijo (AML), ki je po PKMC prejela virusno specifične limfocite proti CMV, AdV in SARS-CoV-2.

Gre za sedemnajstletno dekle, pri katerem je bila citopenija prvič ugotovljena maja 2022. Nato je bila novembra 2022 s kostno punkcijo potrjena diagnoza AML –MR (M4), ki je imela kompleksno preurejen kariotip: t(7;21), del(5q), del(11p).

Za indukcijsko zdravljenje je prejela 2 bloka kemoterapije CPX351 (Vyxeos), uvedena je bila profilaksa s posokonazolom in primotrenom. Po tem je prejela daunorubicin v skupnem odmerku 130 mg/m².

V sklopu pretransplantacijske evaluacije je imela opravljen CT pljuč, ki je pokazal nekaj manjših zgostitev mlečnega stekla, zato smo zamenjali posakonazol za liposomalni amfotericin B ob sumu na možno glivično okužbo pljuč.

V sklopu PKMC HLA skladnega nesorodnega dajalca (10/10) je prejela kondicioniranje po shemi busulfan, ciklofosamid in melfalan. Za in vivo deplecijo celic T je prejela ATG Grafalon[®], a je ob prvi aplikaciji prišlo do sistemske alergijske reakcije, tako da je prejela skupno le 1/6 celotnega odmerka, zato je namesto tega prejela alemtuzumab v skupnem odmerku 55 mg.

Alogenska PKMC je bila opravljena 24. in 25.2.2023 v odmerku $7,5 \times 10^6$ celic CD34+/ kg TT. Za profilakso GVHD je prejela ciklosporin in metotreksat, za profilakso okužb pa aciklovir in liposomalni amfotericin B.

Na D+10 je prišlo do poslabšanja respiratornega stanja s potrebo po dodatku kisika v vdihanem zraku, na rentgenogramu prsnih organov so bili prisotni difuzni alveolarni infiltrati

NaD+22 je prišlo do vgnezditev presadka, obenem pa tudi do poslabšanja pljučne simptomatike in zaradi suma na sindrom vgnezditev smo uvedli metilprednizolon v odmerku 1 mg/kg/d telesne teže. Po prehodnem izboljšanju smo na D+31 prvič diagnosticirali svežo okužbo s SARS-CoV-2 in takoj pričeli zdravljenje z remdesivirjem ter paxlovidom, nadomeščali imunoglobuline ob hipogamaglobulinemiji in pričeli zniževati odmerek metilprednizolona do 0,66 mg/kg/d.

Zaradi akutne respiratorne odpovedi je bila 2.4.2023 premeščena na intenzivni COVID oddelek Infekcijske klinike, dne 3.4.2023 je prejela pulz metilprednizolona v odmerku 1000 mg s postopnim zniževanjem, čez teden dni pa je bila zaradi poslabšanja stanja premeščena na CIIM.

Zaradi suma na preplet treh entitet posttransplantacijskih zapletov, in sicer GVHD, glivične in virusne okužbe je bolnica dvakrat prejela mezenhimske matične celice v odmerku 1×10^6 /kg, saj se je klinično stanje vztrajno slabšalo kljub zdravljenju GVHD s kortikosteroidi.

Zaradi vztrajanja visokega bremena SARS-CoV-2 smo sočasno pričeli tudi postopek za pridobitev virusno specifičnih limfocitov T s strani sodelavcev Zavoda za transfuzijsko medicino (ZTM), ki so pregledali in tipizirali družinske člane. Tipizirali smo virusno različico SARS-CoV-2,

preverili nivo zaščitnih protiteles pri bolničini mami, ter nivo nevtralizacijskih protiteles. Sočasno je bolnica zaradi težkega stanja prejela prebolevniško plazmo prostovoljnih darovalcev. Vzporedno smo ugotavljali še sistemsko reaktivacijo CMV, BKV in AdV.

Po pridobitvi zelenih podatkov in pripravi virusno specifičnih limfocitov s strani ekipe ZTM smo z namenom optimalnega zmanjšanja virusnega bremena tako SARS-CoV-2 kot CMV predvideli aplikacijo virusno specifičnih limfocitov (anti-CMV, anti-SARS-CoV-2) haploidentične darovalke, bolničine mame.

Ta oblika zdravljenja je bila predlagana zaradi življenjske ogrožajočega kliničnega stanja z namenom izboljšanja T celične imunosti, saj je bila bolnica globoko limfopenična zaradi mieloablativnega kondicioniranja in je še vedno prejela imunosupresivno zdravljenje. Tako smo 26.4.2023 prvič aplicirali virusno specifične T-limfocite proti SarS-CoV-2, 24.5.2023 pa smo prvič aplicirali virusno specifične T limfocite proti CMV in AdV v enem celičnem pripravku.

Tri tedne kasneje, 12.6.2023, se je pri bolnici pojavil sindrom sistemskega kapilarnega popuščanja, etiološko najverjetneje kot kombinacija okvare endotela majhnih žil po alogenski presaditvi KMC nesorodnega dajalca, oportunističnih okužb in specifičnega posttransplantacijskega zdravljenja, zato so bile tudi aplikacije virusno specifičnih limfocitov preložene. Za prvo linijo zdravljenja tega stanja je bolnica prejela kortikosteroide, pentaglobin in plazmaferezo. Po tednu dni zdravljenja s steroidi ni prišlo do želenega učinka, zato smo se po pregledu strokovne medicinske literature za zdravljenje drugega reda odločili za uvedbo bevacizumaba, ki ga je prvič prejela 12.6.2023.

Tri dni kasneje, 15.6.2023, je bolnica umrla zaradi sistemskega sindroma kapilarnega prepuščanja in multiorganske odpovedi.

Literatura:

1. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2022.12.002>
2. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-628982>
3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36049482>
4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8821006/>

Vloga ECP pri zdravljenju T celičnih limfomov

Mateja Dolenc-Voljč

Dermatovenerološka klinika, UKC Ljubljana, Gradiškova ulica 10, 1000 Ljubljana

mateja.dolenc-voljc@mf.uni-lj.si

Primarni kožni T-celični limfomi (KTCL) so heterogena skupina limfoproliferativnih bolezni, ki nastanejo primarno v koži zaradi nenadzorovanega razraščanja in maligne preobrazbe limfocitov T. Predstavljajo 70 do 80% vseh primarnih kožnih limfomov. Incidenca KTCL je ocenjena na 8,55 primerov na milijon prebivalcev in naj bi bila v zadnjih desetletjih v porastu. Najpogosteje se pojavijo med 55. in 60. letom starosti. Najpogostejša je mycosis fungoides (MF), ki med KTCL predstavlja 60%. Najtežja oblika je Sézary sindrom, pri kateri je identični maligni klon limfocitov T že v začetku bolezni prisoten v koži, bezgavkah in krvi in predstavlja 5% vseh KTCL. Zdravljenje KTCL prilagajamo stadiju bolezni, upoštevajoč starost bolnikov in pridružene bolezni. Uporabljamo različne možnosti lokalnega zdravljenja, radioterapijo, fototerapijo z UVB ali UVA žarki in različna sistemska zdravila. V čim večji možni meri se skušamo izogniti citotoksičnim zdravilom. Bolnike s težje potekajočimi KTCL obravnavamo v terciarni ustanovi in interdisciplinarno.

Popolna ozdravitev KTCL ni možna, z ustreznim zdravljenjem pa lahko zmanjšamo tumorsko breme v koži, izboljšamo kožne spremembe, preprečimo ali upočasnimo širjenje bolezni, podaljšamo obdobja remisije, zmanjšamo srbež in izboljšamo kakovost bolnikovega življenja.

Od prvega strokovnega poročila o zunajtelesni fototerapiji (ECP) kot obetavnem načinu zdravljenja KTCL, leta 1987, je ECP postala uveljavljena metoda za zdravljenje teh limfomov. Znano je, da ECP povzroči apoptozo T limfocitov, novejša raziskave pa ugotavljajo tudi imunomodulatorne in protivnetne učinke, kot posledica modulacije dentritičnih celic, sprememb v citokinskem profilu celic, vplivu na porušeno ravnovesje Th1/Th2 v smeri okrepitve imunskega odgovora Th2 in stimulacije regulatornih celic T. Kljub dolgoletni uporabi v klinični medicini pa mehanizmi delovanja ECP pri KTCL še niso povsem pojasnjeni. Za razliko od mnogih sistemskih

zdravil, ki jih uporabljamo pri KTCL, ECP ne povzroča imunske oslabelosti organizma in ne poveča tveganja za oportunistične okužbe.

Analiza 30 različnih kliničnih raziskav, pri skupno 689 bolnikih s KTCL, objavljenih med 1987 in 2007, je pokazala celotni delež odziva na zdravljenje (popolni in delni odziv) pri 63% bolnikov (v razponu med 33 do 100%), popolni odziv pa je bil dosežen pri 20% bolnikov (v razponu med 0 in 62%). Raziskave, objavljene v letih med 2007 in 2011, so pokazale celotni delež odziva med 42 in 80% bolnikov, popolni odziv pa v razponu med 0 in 30% zdravljenih. Razlike med raziskavami so verjetno posledica različne selekcije bolnikov, različnih stadijev KTCL, različnega predhodnega zdravljenja in različne metodologije ECP.

Evropske smernice za zdravljenje MF in Sézary sindroma priporočajo ECP kot metodo prve izbire pri eritrodermični MF v stadiju IIIA ali IIIB, stadiju IV in pri Sézary sindromu. Tem priporočilom sledimo tudi v Sloveniji. Čeprav raziskave potrjujejo učinkovitost ECP tudi v nižjih stadijih MF (IA, IB, IIA), se ECP v teh primerih priporoča le za klinične raziskave.

Glede na klinično in imunofenotipsko heterogenost KTCL, je odgovor bolnikov na zdravljenje z ECP lahko individualno zelo različen. Pomembna je dobra predhodna klinična selekcija bolnikov. Med napovedne dejavnike za dober odziv uvrščamo: kratek čas trajanja bolezni (manj kot dve leti od diagnoze), eritrodermijo, plake v obsegu manj kot 15% telesne površine, odsotnost izrazite limfadenopatije, odsotnost prizadetosti notranjih organov, odsotnost predhodne intenzivne kemoterapije, dober odziv na ECP po 6 mesecih zdravljenja, normalno vrednost LDH, vrednost limfocitov manj kot 20.000/ μ L in še nekatere druge laboratorijske in imunofenotipske kriterije.

Ciklusi ECP sprva potekajo na 2 tedna (1 cikel po 2 zaporedna dneva), ob izboljšanju se intervali podaljšajo na 4 tedne, kasneje na 8 tednov, zdravljenje pa naj bi skupno trajalo več kot 2 leti. Najkrajše obdobje za oceno učinkovitosti ECP je 6 mesecev. Nadaljevanje zdravljenja z ECP je priporočljivo v primeru popolnega ali delnega odziva, pa tudi v primeru minimalnega kliničnega izboljšanja.

V Sloveniji zdravljenje KTCL z ECP poteka od decembra 2013 na Zavodu za transfuzijsko medicino. Bolniki, zdravljeni z ECP, so imeli MF v stadiju III ali IV, večina pa Sézary sindrom, s težko prizadetost kože (eritrodermijo, močno hiperkertoza dlani in stopal, razširjeno alopecijo), povečane bezgavke in levkocitozo. Pri mnogih bolnikih smo zdravljenje z ECP kombinirali z drugimi sistemskimi zdravili: interferonom, metotreksatom ali retinoidi (acitretinom ali beksarotonom). Slovenske izkušnje zdravljenja z ECP pri KTCL so dobre. Pri mnogih bolnikov smo dosegli delno remisijo, izboljšanje prizadetosti kože in krvne slike, brez pomembnih zapletov ali neželenih učinkov na splošno zdravstveno stanje bolnikov. Nekateri bolniki zdravljenje z ECP nadaljujejo že več kot 3 leta.

Zdravljenje z ECP v prihodnosti prihaja v poštev tudi za nekatere druge dermatološke bolezni, pri katerih so v etiopatogenezi pomembni limfociti T in niso odzivne na standardno zdravljenje: sklerodermija, težje oblike atopijskega dermatitisa, pemfigus, epidermolysis bullosa acquisita in erozivni oralni lichen planus.

Literatura:

1. Latzka J, Assaf C, Bagot M, Cozzio A, Dummer R, Guenova E et al. EORTC consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome – Update 2023. *Eur J Cancer* 2023;195:1133-43.
2. Hristov AC, Tejasvi T, Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphomas: 2023 update in diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2023;98:193-209.
3. Knobler R, Arenberger P, Arun A et al. European dermatology forum – updated guidelines on the use of extracorporeal photopheresis 2020 – part 1. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2020, 34:2693-716.
4. Knobler R, Arenberger P, Arun A, Assaf C, Bagot M, Berlin G et al. European dermatology forum – updated guidelines on the use of extracorporeal photopheresis 2020 – part 2. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2021,35:27-49.
5. Jezeršek Novaković B, Boltežar B, Eberl L, Gašljević A, Grčar-Kuzmanov B, Jagodic M et al. Priporočila za obravnavo bolnikov z malignimi limfomi. Dosegljivo 24. 3. 2024 s spletne strani: <https://www.onko-i.si/priporocila>
6. Arun A, Taylor PC, Dignan F, El-Ghariani K, Griffin J, Gennery AR et al. The role of extracorporeal photopheresis in the management of cutaneous T-cell lymphoma,

- graft-versus-host disease and organ transplant rejection: a consensus statement update from the UK Photopheresis Society. *Br J Haematol* 2017;177:287–310.
7. Scarisbrick JJ, Taylor P, Holtick U et al. U.K. consensus statement on the use of extracorporeal photopheresis for treatment of cutaneous T-cell lymphoma and chronic graft-versus-host disease. *Br J Dermatol* 2008;158:659-78.
 8. Kempf W, Stadler R. Cutaneous Lymphomas. In: Plewig G, French L, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M, eds. *Braun Falco's Dermatology*. 4rd ed. Berlin: Springer; 2022. p. 1931-54.

Napredna zdravljenja (ZTMS)

Pregled naših bolnikov za CAR-T – Onkološki inštitut Ljubljana

Lučka Boltežar^{1,2}

1 – Sektor internistične onkologije, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

2 – Medicinska fakulteta, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

lboltezar@onko-i.si

Uvod

CAR-T terapija je spremenila zdravljenje malignih limfomov. Število produktov po svetu narašča, poteka veliko študij v vseh linijah zdravljenja, problem je visoka cena terapije ter dostopnost. V Sloveniji imamo na voljo Tisagenlecleucel za tretjo linijo zdravljenja difuznega velikoceličnega limfoma B. V prispevku bodo na kratko predstavljene raziskave, na katerih slonijo indikacije za zdravljenje v tujini ter predstavljena analiza bolnikov iz Onkološkega inštituta Ljubljana.

CAR-T v tretji liniji zdravljenja

V raziskavi ZUMA-1, šlo je za mednarodno, multicentrično raziskavo faze II, so testirali axi-cel (angl. Axicabtagene ciloleucel) pri bolnikih z difuznim velikoceličnim limfom B (DVCBL), primarnim mediastinalnim limfomom B (PMBL) in transformiranim folikularnim limfomom (FL). Mediano število predhodnih linij je bilo 3. Premostitvena kemoterapija ni bila dovoljena. Vključenih je bilo 111 bolnikov, 91% jih je prejelo celice CAR-T. Objektivni odgovor je bil zabeležen pri 83% in delež kompletnih odgovorov je znašal 58%. Ob medianem času spremljanja 63,1 meseca je odgovor na zdravljenje vztrajal pri 31% bolnikov. Mediano celokupno preživetje je znašalo 25,8 mesecev in ocenjeno pet-letno preživetje je znašalo 42,6%.

Tisa-cel (angl. Tisagenlecleucel) je bil preizkušen v raziskavi JULIET, ki je bila mednarodna raziskava faze II pri bolnikih z refraktarnim DVCBL, ki niso bili primerni za avtologno presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC) ali so doživeli napredovanje bolezni po avtologni PKMC. 92% jih je dobilo premostitveno terapijo. Večina je prejela že dve liniji zdravljenja ali več. Primarni cilj je bil najboljši celokupni odgovor (definiran kot delež bolnikov, ki so dosegli popolni odgovor). Vključenih je bilo 167 bolnikov, medtem ko je tisa-cel dejansko dobilo 115 bolnikov in so bili primerni za končno analizo podatkov. Ob medianem času spremljanja 40,3 mesecev je bil celokupni delež odgovorov 53% (95% interval zaupanja (IZ) 43,5-62,4) – 61 izmed 115 bolnikov, medtem ko je 45 bolnikov imelo popolni odgovor na zdravljenje (39%). Bolniki, ki niso prišli do infuzije CAR-T so bili pogosteje refraktarni na zadnji red kemoterapije pred vključitvijo in so imeli slabše stanje zmogljivosti po WHO.

TRANSCEND NHL 001 je preizkušala tri tarčne doze liso-cel produkta (angl. Lisocabtagene maraleucel) pri bolnikih z DVCBL, PMBL, transformiranimi indolentnimi limfomi v agresivnejšo varianto ter FL gradus IIIb. Levkaferezo je opravilo 344 bolnikov, od tega je liso-cel prejelo 269 bolnikov. Mediano število predhodnih zdravljenj je bilo 3. V analizo učinkovitosti zdravila je bilo vključenih 257 bolnikov, ki so dosegli objektivni odgovor v 73%, (95% IZ 66,8- 78,0) in popolni odgovor v 53% (95% IZ 46,8-59,4). Mediani čas spremljanja je bil 19,9 meseca. Mediano preživetje brez napredovanja bolezni je bilo 6,8 meseca in mediano celokupno preživetje je bilo 27,3 meseca.

Vse tri študije so vodile v odobritev vseh treh produktov tako v Evropi kot tudi v Ameriki za zdravljenje velikoceličnih limfomov B v tretji liniji zdravljenja.

CAR-T v drugi liniji zdravljenja

Študija Transform je primerjala CAR-T terapijo liso-cel s standardno roko – avtologno PKMC za bolnike, ki so bili neodzivni na prvo linijo zdravljenja ali so imeli ponovitev bolezni znotraj 12 mesecev po zaključenem zdravljenju. Primarni cilj je bil preživetje brez dogodka. Delež popolnih odgovorov je znašal 74% v skupini liso-cel in 43% v skupini z avtologno PKMC ($p < 0,0001$), mediano preživetje brez napredovanja bolezni ni bilo doseženo za liso-cel, medtem ko je bilo 6,2 meseca v skupini z avtologno PKMC (razmerje tveganj (RT)=0.400, $p < 0,0001$). Mediano celokupno

preživetje ni bilo doseženo za skupino liso-cel medtem ko je bilo 29,9 meseca v skupini z avtologno PKMC (RT=0,724, p=0,0987). Ob uravnavi zaradi prehajanja bolnikov iz standardne roke v roko z liso-cel, je bilo 18-mesečno celokupno preživetje 73% za liso-cel in 54% za standardno roko (RT=0,415).

Raziskava ZUMA-7 je primerjala zdravljenje z axi-cel v drugi liniji z avtologno PKMC pri bolnikih, ki so bili refraktarni na prvo linijo zdravljenja ali so imeli napredovanje bolezni znotraj 12 mesecev po zaključeni terapiji prvega reda. Šlo je za mednarodno randomizirano študijo faze III, ki je vključila 359 bolnikov. Primarni cilj raziskave je bilo preživetje brez dogodka. Ob medianem času spremljanja 24,9 mesecev je bilo preživetje brez dogodka v skupini axi-cel 8,3 meseca v primerjavi z avtologno PKMC, kjer je znašalo 2 meseca. V skupini axi-cel je bilo 24-mesečno preživetje brez dogodka 41% in v skupini s PKMC 16% (RT=0,4, 95% IZ 0,31-0,51, p<0,001). Odgovor so zabeležili pri 83% bolnikov v skupini axi-cel in v 50% v skupini z avtologno PKMC, delež popolnih odgovorov pa je znašal 65% v skupini axi-cel in 32% v skupini s PKMC.

Tudi tisa-cel je bil testiran v randomizirani raziskavi faze III nasproti avtologni PKMC. Randomiziranih je bilo 322 bolnikov, ki so bili refraktarni na prvo linijo zdravljenja ali so imeli napredovanje bolezni znotraj 12 mesecev po zaključeni terapiji prvega reda. Mediani čas od levkafereze do infuzije produkta je bil 52 dni. V roki s tisa-cel-om je 95,7% bolnikov dobilo produkt, med tem ko je v roki z avtologno PKMC le 32,5% bolnikov dejansko prejelo presadek KMC. Napredovanje bolezni v prvih šestih tednih po tisa-cel-u je imelo 25,9% bolnikov, medtem ko je znašal ta delež bolnikov v skupini z avtologno PKMC 13,8%. Preživetje brez dogodka je bilo v obeh skupinah 3 mesece (RT= 1,07, 95% IZ 0,82-1,40, p=0,61). Odgovor na zdravljenje je bil zabeležen v 46,3% v tisa-cel skupini in v 42,5% v skupini z avtologno PKMC.

Liso-cel in axi-cel sta odobrena s strani FDA in EMA za drugo linijo zdravljenja za refraktarne bolnike z DVCBL in visoko malignimi limfomi B, in tiste bolnike, ki imajo napredovanje bolezni znotraj 12 mesecev po zaključenem zdravljenju.

CAR-T v prvi liniji zdravljenja

V raziskavi Zuma-12, ki je bila študija faze II, multicentrična, z eno roko, je bil preizkušen axi-cel kot del zdravljenja prvega reda po dveh ciklikih kemoimunoterapije. Vključeni so bili visoko rizični bolniki z velikoceličnimi B limfomi, ki so imeli PET-CT po dveh ciklikih še pozitiven, t.i. double in triple-hit limfomi ter bolniki z visokim-srednjim ali visokim mednarodnim prognostičnim indeksom IPI (torej več kot 3 točke). Primarni opazovani dogodek je bil delež popolnih odgovorov. Med sekundarnimi cilji so bili tudi delež objektivnih odgovorov, trajanje odgovora in preživetje brez dogodka. Primarni cilj je bil dosežen ($n = 37$) z 78% deležem popolnih odgovorov (95% IZ 62-90) in 89% objektivnih odgovorov (95% IZ 75-97). Ob medianem času spremljanja 16 mesecev je 73% bolnikov ostalo v objektivnem odgovoru, mediano trajanje odgovora in preživetje brez napredovanja bolezni pa ni bilo doseženo. Poteka pa tudi randomizirana raziskava faze III z randomizacijo po enem ciklusu rituksimab-kemoterapije v roko z axi-cel-om in v roko s standardnim zdravljenjem (R-CHOP ali R-EPOCH).

Pregled bolnikov Onkološkega inštituta Ljubljana

Ob vzpostavitvi centra za CAR-T v Univerzitetnem kliničnem centru (UKC) Ljubljana smo leta 2020 pregledali vse naše bolnike, zdravljenje v preteklih nekaj letih (z vsaj enoletnim časom spremljanja) z diagnozo difuzni velikocelični B limfom, folikularni limfom ter primarni mediastinalni B limfom. Naš namen je bil oceniti, koliko bolnikov realno pride do tretje linije zdravljenja in koliko jo tudi dejansko dobi. Potencialno število bolnikov, primernih za CAR-T, je predstavljeno v Tabeli 1. Pomembno je poudariti, da gre le za štetje bolnikov, ki so dejansko dobili tretji red zdravljenja s kemoterapijo, niso pa upoštevane pridružene bolezni bolnika, ocena srčne funkcije in drugi parametri, ki bi utegnili vplivati na oceno, ali je bolnik zmožen za CAR-T ali ne.

Leto	Št. Bolnikov z DVCBL	Št. Potencialnih kandidatov v tretjem redu zdravljenja	Št. Potencialnih kandidatov s transformiranim FL	Št. Potencialnih kandidatov s PMBL	Skupno število potencialno primernih bolnikov za zdravljenje s CAR-T
2015	99	6	1	2	9
2016	103	5	1	3	9
2017	73	1	0	0	1
2018	76	2	0	1	3

Tabela 1: Potencialno število primernih bolnikov za CAR-T med leti 2015 in 2018. DVCBL – difuzni velikocelični B limfom, FL – folikularni limfom, PMBL – primarni mediastinalni B limfom,

Od sredine leta 2020, ko je Kymriah® dostopna našim bolnikom, je bilo s strani Onkološkega inštituta Ljubljana na transplantacijskem sestanku v UKC Ljubljana predstavljenih 20 potencialnih kandidatov za zdravljenje s CAR-T. Štirje bolniki so bili zavrnjeni na samem sestanku, dvema od njih je bila ponujena avtologna PKMC, vendar nobeden od njiju ni prišel do transplantacije (1 bolnik umrl v progresu, 1 bolnica ni zbrala celic). Za dva bolnika so bile omejujoče pridružene bolezni. Trinajst terapij s CAR-T je bilo izvedenih pri bolnikih iz Onkološkega inštituta, 1 bolnica ima shranjen celični pripravek, vendar je zdravljenje trenutno odloženo zaradi slabega stanja zmogljivosti in ponavljajočih se okužb. Dva bolnika sta žal doživela hitro napredovanje bolezni, še preden so bile celice CAR-T izdelane in pripeljane v Slovenijo. Osem od 13 bolnikov je imelo po CAR-T terapiji napredovanje bolezni, štirje so v popolni remisiji (vsi štirje so transformirani folikularni limfomi). En bolnik še čaka evaluacijo po aplikaciji celic.

Zaključek

CAR-T terapija je obetavna možnost zdravljenja bolnikov z limfomi, indikacije se v svetu bliskovito širijo. Posamezni produkti se premikajo v zgodnejše linije zdravljenja. V Sloveniji je na voljo preparat Novartisa v tretji liniji zdravljenja. Zdravljenje je v celoti krito s strani ZZSZ. Ob širitvi indikacij pričakujemo tudi več bolnikov, ki bodo tovrstno zdravljenje potrebovali.

Literatura:

1. Abramson JS, Solomon SR, Arnason J. Lisocabtagene maraleucel as second-line therapy for large B-cell lymphoma: primary analysis of the phase 3 TRANSFORM study. *Blood*. 2023;141(14):1675-1684. doi: 10.1182/blood.2022018730.
2. Neelapu SS et al, Axicabtagene ciloleucel as first-line therapy in high-risk large B-cell lymphoma: the phase 2 ZUMA-12 trial. *Nat Med*. 2022;28(4):735–742.
3. Bishop MR, Dickinson M, Purtil D. Second-Line Tisagenlecleucel or Standard Care in Aggressive B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2022;386:629-639. DOI: 10.1056/NEJMoa2116596.
4. Locke F, Miklos DB, Jacobson CA. Axicabtagene Ciloleucel as Second-Line Therapy for Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2022;386:640-654 DOI: 10.1056/NEJMoa2116133.
5. Neelapu SS, Jacobson CA, Ghobadi A. Five-year follow-up of ZUMA-1 supports the curative potential of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma. *Blood*. 2023;141(19):2307-2315. doi: 10.1182/blood.2022018893.
6. Schuster SJ, Tam CS, Borchmann P. Long-term clinical outcomes of tisagenlecleucel in patients with relapsed or refractory aggressive B-cell lymphomas (JULIET): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2021;22(10):1403-1415. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00375-2.
7. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI. Two-year follow-up of lisocabtagene maraleucel in relapsed or refractory large B-cell lymphoma in TRANSCEND NHL 001. *Blood*. 2024;143(5):404-416. doi: 10.1182/blood.2023020854.

Zdravljenje poobsevalne kserostomije pri bolnikih z rakom ustnega žrela z alogenskimi mezenhimskimi stromalnimi matičnimi celicami: protokol klinične raziskave

Primož Strojani¹, Urban Švajger²

1 Sektor radioterapije, Onkološki inštitut Ljubljana

2 Zavod RS za transfuzijsko medicino

pstrojan@onko-i.si

Uvod. Rak glave in vratu (RGV) je po pogostosti v svetu na 6. mestu. V Sloveniji vsako leto za tem rakom zboli od 450 do 500 ljudi. Z obsevanjem z ionizirajočimi žarki ali radioterapijo je zdravljeno preko 80% teh bolnikov. Kljub izjemnemu tehnološkemu napredku, ki omogoča bolj natančno določitev lege tumorja in zamejitev doze sevanja na želeno področje, so poleg tumorja, sicer z nižjo dozo, obsevana tudi tkiva v njegovi okolici, v primeru RGV med drugimi tkivi/organi tudi žleze slinavke. Če preseže doza sevanja, ki jo prejmejo predvsem obušesni in submandibularni žlezi določen prag, lahko po zdravljenju pričakujemo razvoj kserostomije. Po dveh letih je stopnja kserostomije dokončna in ireverzibilna. Nastali subjektivni občutek suhih ust je torej posledica okrnjenega delovanja žlez slinavk, ki se kaže z zmanjšanjem količine in s spremenjeno sestavo izločene sline (postane gosta in lepljiva). S kserostomijo povezani znaki in simptomi kot so zobni karies, pekoča usta, motnje okusa, težave pri hranjenju idr., zmanjšujejo kakovost bolnikovega življenja.

Obstoječi terapevtski pristopi so vprašljivega učinka in ne vplivajo na regeneracijo z obsevanjem poškodovanega žleznega tkiva. Zdravila za napredno zdravljenje na osnovi mezenhimskih stromalnih/matičnih celic (MSC) predstavljajo novo terapevtsko možnost, saj učinkujejo preko mehanizmov z imunomodulatornimi in regenerativnimi učinki. Prvim poročilom o zdravljenju kserostomije z MSC na živalskih modelih pred približno desetimi leti je leta 2018 sledila objava rezultatov faza I/II klinične raziskave na ljudeh; uporabljene so bile avtologne MSC. Prvo poročilo o uporabi alogenskih MSC, pridobljenih iz maščobnega tkiva, je bilo objavljeno leta 2022. V obeh

raziskavah je aplikacija MSC vplivala pozitivno na količino izločene sline po enem in štirih mesecih (v eni od obeh raziskav tudi po 3.6 letih); stranskih učinkov niso ugotavljali.

Namen. Preveriti varnost in preliminarno učinkovitost zdravljenja kserostomije z alogenskimi MSC, pridobljenimi iz tkiva popkovnice, ki jih odlikuje visoka stopnja matičnosti in izrazito imunomodulatorno delovanje.

Material in metode. Vključenih bo 10 bolnikov. Vključitveni pogoji so naslednji: kurativno zdravljenje ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela s (kemo)radioterapijo zaključeno pred ≥ 2 letoma in brez ponovitve bolezni; povprečna prejeta doza sevanja na parotidni in submandibularni žlezi >26 Gy oz. >35 Gy; kserostomija stopnje 2-3 (lestvica CTCEA v.5.0); nekadilci. Načrtovane preiskave in postopki so predstavljeni v tabeli. Dodatno bo vključenih 10 zdravih posameznikov (kontrolna skupina), pri katerih bomo opravili le slinski test in analizo sestave sline.

Postopek	Vključevanje	Intervencija	Preiskave med sledenjem			
			Dan 1	Dan 5	Dan 28	Dan 120
	Teden 4→0	Dan 0				
Presejanje bolnikov s klinično in objektivno oceno kserostomije	X					
hemogram, biokemija	X				X	X
Testi koagulacije	X					
Meritve nestimuliranega in stimuliranega pretoka sline	X				X	X
Analiza sestave sline	X				X	X
Magnetnoresonančno slikanje	X				X	X
Ultrazvok (elastografija)	X				X	X
Scintigrafija s [^{99m} Tc]Tc-HMPAO označenimi MSCs		X				
Scintigrafija ([^{99m} Tc]TcO ₄)	X					X
Debeloigelnna biopsija žleze	X					X
Vprašalnik VAS	X				X	X
Vprašalnik o kserostomiji	X				X	X
Vprašalnik EORTC QLQ-H&N35	X				X	X
Ocena toksičnosti (CTCAE v5)		X	X	X	X	X

Zaključek. Pričakujemo, da bodo rezultati pomembno prispevali k optimizaciji zdravljenja poobsevalne kserostomije z MSC. V kolikor se bo izkazalo za varno in učinkovito, bo na voljo tudi slovenskim bolnikom.

Gensko-modificirane MSC v onkologiji

Urban Švajger ^{1,2}, Urška Kamenšek ^{3,4}

¹ Zavod RS za transfuzijsko medicino, Oddelek za terapevtske storitve, Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

³ Onkološki Inštitut Ljubljana, Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

⁴ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana

Povzetek

Mezenhimske stromalne matične celice (MSC) so pritegnile precejšnjo pozornost na kliničnem področju regenerativne medicine in celične imunoterapije, predvsem zaradi svojih izrazitih terapevtskih prednosti, zaradi česar so v središču številnih raziskav. Med vsemi platformami celične in genske terapije je najširšo klinično uporabnost nedvomno moč opaziti pri MSC. To velja za različne metode, ki so na voljo za proizvodnjo in manipulacijo zdravil za napredno zdravljenje (ATMP – Advanced Therapy Medicinal Products) na osnovi MSC, kar posledično predstavlja različne tipe zdravil. Poleg tega lahko ATMP, ki temeljijo na MSC, uporabljamo za širok spekter bolezni, kar dodatno poudarja njihovo obsežno uporabnost za klinične namene. Za onkološke namene MSC ponujajo možnost genske modifikacije za transport širokega nabora protitumorskih učinkovin. Te vključujejo onkolitične viruse, mikroRNA s proti-rakavim delovanjem, kot je miR-124a, citotoksične molekule, vključno s TNF-povezanim ligandom, ki inducira apoptozo (TRAIL), proteine, ki zavirajo tumorje, kot je kostni morfogogenetski protein-4, in različne citokine. V tem smislu MSC predstavljajo skoraj idealen celični dostavni sistem. MSC lahko namreč pridobivamo v izobilju iz relativno dostopnih virov, kot sta npr. popkovnica ali maščobno tkivo. Njihovo pomnoževanje *ex vivo* je v primerjavi z drugimi vrstami celic nezapleteno, njihova nizka imunogenost pa pomeni, da so primerne za alogenske aplikacije. Bistveno je, da imajo MSC

inherentno sposobnost odzivanja na kemotaktične signale, ki usmerja njihovo migracijo proti tumorjem.

Glede na njihov močan vpliv na imunski sistem in ključno vlogo pri obrambi proti raku, zavzemajo citokini pomemben položaj v genetski oborožitvi MSC. Omogočajo nam, da celične terapevtike kot so MSC spremenimo v zelo učinkovite in regulirane imunske efektorske celice, ki lahko neposredno zavirajo napredovanje tumorja ali zagotavljajo ključno podporo proti-tumorskim imunskim odzivom. V zadnjem času je prišlo do izjemnega porasta predkliničnih in kliničnih raziskav, ki se ukvarjajo s potencialom citokinov kot zdravljenja raka. Ta ponoven porast zanimanja izhaja iz širšega premika zdravljenja raka proti kombiniranim pristopom, kot je krepitev terapije zaviranja imunskih kontrolnih točk, skupaj z opaznimi tehnološkimi koraki v formulaciji in dostavi citokinov, kar olajša njihovo ciljno in lokalizirano delovanje. Genetska modifikacija MSC izstopa kot ključni napredek na tem področju, saj obravnava oba ta vidika in se tako izogne pogostim težavam, povezanim s sistemsko terapijo s citokini, zlasti visoki toksičnosti in kratki sistemski razpolovni dobi. Predstavili bomo pomen oborožitve MSC z uporabo različnih citokinov in drugih molekul ter pojasnili ključne imunološke mehanizme, vključno z metodologijami genskega inženiringa in optimalnih strategij za izkoriščanje MSC pri nenehnem napredku razvoja učinkovitih terapevtskih pristopov proti raku.

Priprava naprednih celičnih zdravil v GMP okolju

Katrina Hartman

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šljajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

Katrina.hartman@ztm.si

Oddelek za terapevtske storitve (OTS) Zavoda RS za transfuzijsko medicino (ZTM) pripravlja zdravila za napredno zdravljenje (ZNZ) od leta 2018. Konec lanskega leta je Javna agencija za zdravila in medicinske pripomočke ZTM kot proizvajalcu ZNZ izdala certifikat skladnosti z dobro proizvodno prakso (GMP).

S tem je ZTM pridobil dovoljenje za proizvodnjo ZNZ tudi za klinične študije (poleg nerutinsko pripravljenih zdravil). Smernice GMP so zapisane v dokumentu Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products. Za pridobitev certifikata je OTS nadzornemu organu pokazal, da proizvodnja ZNZ v vseh elementih ustreza standardom GMP - osebje, prostori in oprema, dokumentacija, vhodne snovi in surovine, celična banka in zamrznjene celične enote, postopki v proizvodnji, kvalifikacije in validacije, odgovorna oseba in sproščanje serije v uporabo, kontrola kakovosti, zunanji izvajalci, vodenje odstopanj in možnost odpoklica serije.

Med najpomembnejšimi elementi proizvodnje je aseptično delo, ki poteka v čistih prostorih. Tako imenujemo sklop prostorov, kjer vzdržujemo posebne pogoje in so ločeni od drugih prostorov. Prostori so dovolj veliki, primerni in opremljeni za namen proizvodnje ZNZ. Oblikovani so tako, da ne more priti do navzkrižnega onesnaženja ter jih lahko enostavno in učinkovito čistimo. Čisti prostori so konstruirani tako, da prehajamo iz enega prostora v drugega – iz zunanjega nečistega (nenadzorovanega) prostora proti čistejši (nadzorovani) notranjosti. Razlikujejo se po čistosti zraka – mikrobiološko in po številu neviabilnih delcev. Označeni so kot razredi čistosti A, B, C in D, kjer je A najčistejši prostor. Prav tako se med prostori vzdržuje nadtlak (10 do 15 Pa) in sicer naraščajoče od razreda čistosti D proti A, kar preprečuje vdor nečistega zraka v notranjost. Med

delom se v brezprašni komori in v delovnem prostoru meri število neviabilnih delcev. Poleg tega med delom v brezprašni komori spremljamo tudi kakovost zraka v njej. Vsakokrat po končanem delu odtisnemo prste obeh rok na agarni plošči za kontrolo aseptičnosti naše izvedbe. Smernice GMP za vsakega od razredov čistosti določajo dovoljeno število neviabilnih delcev med delom in v mirovanju (posebej za delce velikosti $\geq 0,5 \mu\text{m}$ in za delce $\geq 5 \mu\text{m}$) oziroma dovoljeno mikrobiološko onesnaženost (število CFU). Proizvodne prostore redno čistimo enkrat mesečno. Vsakokrat sledi mikrobiološki nadzor učinkovitosti čiščenja. V čistih prostorih (poleg nadtlaka) vzdržujemo in nadzorujemo tudi temperaturo in vlažnost.

Poleg čistih prostorov in dela v njih nadzorujemo tudi ostale dele proizvodnje in izvajamo kontrolo kakovosti vsake serije zdravila.

Tako zagotavljamo kakovost, varnost in sledljivost ZNZ.

Strokovni prispevki brez predavanja (ZTMS)

Validacija regularnih rezultatov testiranj in izdaje izvida predtransfuzijskih preiskav
– inženir kot izvajalec

Simona Bezenšek, Tanja Uhan, Sanja Sobočan Koša

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šljajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

sanja_sobocan-kosa@ztm.si

UVOD/IZHODIŠČA

Izvid predtransfuzijskih preiskav v obsegu, kot jih določa Pravilnik o transfuzijskih preiskavah in postopkih ob transfuziji, je pogoj za izdajo krvnih komponent bolniku. Na Odseku za predtransfuzijske preiskave Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino s pomočjo imunohematoloških analizatorjev izvajamo testiranje na popolnoma avtomatiziran način. Analizator pridobljene rezultate samodejno odčita ter opozori na neregularne rezultate ali rezultate, ki jih ne zna interpretirati (mejno reaktivni rezultati, tehnično neuspešno izvedeni testi, ipd.). Izvajalec pridobljene rezultate po protokolu validira/interpretira/zavrne, izvozi v LIS, izda ter verificira izvid.

Konec leta 2023 smo pričeli s spremembo postopka validacije regularnih rezultatov testiranj in izdaje izvida avtomatiziranih preiskav z inženirjem kot izvajalcem.

NAMEN

Prvotni namen je bil razbremeniti zdravnika oziroma optimizirati rasporeditev dela. Z uvedbo spremembe usposobljeni inženirji brez pravno-kadrovskih in strokovnih zadržkov z zmanjšanim tveganjem za napako ob popolnoma avtomatizirani izvedbi in interpretaciji dosegajo višje kompetence glede na izobrazbo.

METODE

Za realizacijo spremembe je bil potreben pregled dotične dokumentacije, priprava krovnega dokumenta z natančno opredeljenimi pojmi, odgovornostjo in postopki, prilagoditev dotične dokumentacije, preverjanje in prilagoditev tehničnih zahtev ter izobraževanje in usposabljanje izvajalcev. Slednje je potekalo na imunohematološkem analizatorju Erytra proizvajalca Grifols po zastavljenem programu izobraževanja in usposabljanja za vse inženirje, zaposlene na Odseku za predtransfuzijske preiskave.

REZULTATI

Uvedba samostojne validacije predtransfuzijskih preiskav s strani inženirjev je bila načrtovana s programom izobraževanja in usposabljanja. Validacija regularnih rezultatov pomeni potrditev interpretacije analizatorja po pregledu skladnosti vizualnega rezultata z odčitkom analizatorja.

V programu je bil določen glavni mentor, dolžina izobraževanja, zadolžitve na dotičnem delovnem mestu, oblike in metode izobraževanja, metode vrednotenja izobraževanja ter učno gradivo.

Individualno izobraževanje za vsakega inženirja je trajalo dva dni. Po seznanjanju z učnim gradivom je sledil prikaz postopka validacije rezultatov in izdaje izvida. Postopek validacije in izdaje izvida obsega prijavo v informacijski sistem, vstop v meni »rezultati«, prikaz rezultatov testiranega vzorca s skeniranjem črtna kode (identa) na naročilnici, identifikacijo pacienta, preverjanje ujemanja podatkov na delovnem nalogu in naročilnici, pregled in zapis rezultatov testiranja, preverjanje prisotnosti rezultatov za vse naročene in potrebne preiskave, zavrnitev rezultatov zaradi tehničnih napak analizatorja, validacijo rezultatov, izvoz rezultatov v LIS ter tiskanje izvida.

Na izvidu sta navedena inženir, ki je samostojno izvedel validacijo rezultatov in odgovorni zdravnik. S podpisom na izvidu zagotavljata, da sta pregledala pomembne podatke na naročilnici, delovnem nalogu in morebitnem komentarju, ter da so interpretirane vse zahtevane in potrebne preiskave, na podlagi katerih so bili izvidi izdani.

Vsak korak postopka je imel strokovno razlago svojega namena tudi v smislu zagotavljanja varnosti oz. minimizacije tveganja. Ves čas usposabljanja je inženir delal pod nadzorom glavnega mentorja. Opravil je pregled vsaj 30 naročil in validacijo vsaj 120 rezultatov preiskav (določitev krvnih skupin ABO, RhD in K ter ostalih klinično pomembnih eritrocitnih antigenov (fenotip Rh, Fy(a,b), Jk(a,b), MN, Ss, idr.), direktnih in indirektnih Coombsovih testov ter navzkrižnih preizkusov).

Naslednji korak izobraževanja je bilo praktično delo v realnem okolju.

Glavni mentor je usposobljenost inženirja preverjal z opazovanjem pri delu, pogovorom in ustnim preverjanjem razumevanja ter razgovorom tekom celotnega usposabljanja.

ZAKLJUČEK

Po uspešno opravljenem izobraževanju in usposabljanju od novembra 2023 dalje teče polletno poskusno obdobje samostojne validacije regularnih rezultatov testiranj in izdaje izvida predtransfuzijskih preiskav s strani inženirjev. Tekom poskusnega obdobja spremljamo rezultate, ki odstopajo od interpretiranih. Pri slednjem gre za subjektivno oceno izvajalca, ki jo je treba preveriti, preden podamo zaključke. Cilj je oceniti število dogodkov ter analizirati klinično napovednost takšnih rezultatov. Po preteku poskusnega obdobja bomo podali oceno tveganja, ki ji bodo po potrebi sledili ukrepi za postavitve čim bolj varnega sistema interpretacije in validacije predtransfuzijskih preiskav v dobrobit bolnika.

Določanje protiteles IgA in anti-IgA na ZTM, naše izkušnje in analiza rezultatov

Maja Černilec*, Marjeta Maček Kvanka*, Melita Gracar, Marjana Šprohar,

Valerija Kovač, Vladka Čurin Šerbec

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Šljajmerjeva 6, Ljubljana

*enakovreden doprinos avtorjev

maja.cernilec@ztm.si, marjeta.macek@ztm.si

Uvod

Pomanjkanje IgA je najpogostejša imunska pomanjkljivost pri ljudeh. Obstajata dve vrsti pomanjkanja IgA, popolno (angl. *severe*) in selektivno pomanjkanje IgA (angl. *selective* z oznako SIgAD), ki se med seboj razlikujeta v stopnji pomanjkanja protiteles IgA. Pri popolnem pomanjkanju je koncentracija protiteles IgA pod 0,5 mg/L, medtem ko je meja določitve diagnoze SIgAD postavljena višje in se med državami razlikuje. Evropsko združenje za imunske pomanjkljivosti (ESID) navaja vrednost za SIgAD do 70 mg/L pri starosti nad 4 leta.

Osebe s pomanjkanjem IgA lahko razvijejo protitelesa anti-IgA.

Namen

V prispevku bomo predstavili analizo podatkov o določanju koncentracije protiteles IgA in prisotnosti protiteles anti-IgA pri preiskovancih s sumom na pomanjkanje IgA, poslanih na ZTM v obdobju med leti 2014 in 2024. Opredelili bomo delež preiskovancev s popolnim pomanjkanjem IgA, preiskovancev s SIgAD ter preiskovancev s protitelesi anti-IgA v obeh skupinah. Pri preiskovancih s prisotnimi anti-IgA bomo predstavili rezultate določanja razredov nastalih protiteles. Pri dveh pacientih z nizkimi vrednostmi protiteles IgA bomo prikazali časovno dinamiko vrednosti koncentracije protiteles IgA in titer protiteles anti-IgA. Naše ugotovitve bomo primerjali s strokovno literaturo in najnovejšimi smernicami.

Metode

Za določanje koncentracije protiteles IgA na ZTM od leta 2014 uporabljamo validiran hišni test ELISA, s katerim lahko ob ustreznem redčenju vzorca zaznamo zelo nizke koncentracije protiteles IgA (> 0,1 mg/L). Točnost določitev preverjamo s sodelovanjem v mednarodnih shemah kakovosti RiQas in INSTAND (12-krat letno shema RiQas, RANDOX, UK, program *Monthly Specific Proteins*; ter 3-krat letno shema INSTAND, Germany, program *Clinical Chemistry - Conventional Analysis*).

Tudi test za določanje prisotnosti protiteles anti-IgA je rezultat našega razvoja. Z njim določamo titer protiteles razredov IgG in IgM. Vsem preiskovancem s prisotnimi protitelesi anti-IgA smo dodatno eksperimentalno določali prisotnost protiteles anti-IgA razreda IgE. V testu smo namesto detekcijskih protiteles, ki so usmerjena proti humanim IgG (Sigma, A0170) oziroma IgM (Sigma, A6907), uporabili protitelesa, ki so umerjena proti humanim IgE (Invitrogen, A 18793).

Rezultati

Analiza rezultatov testiranj na ZTM: delež oseb s popolnim in selektivnim pomanjkanjem IgA

Na ZTM smo v obdobju od 2014 do 2024 testirali vzorce 194 oseb. Vzorce 40-ih preiskovancev smo prejeli večkrat (2 do 5-krat). Skupno smo izvedli 248 preiskav določanja koncentracije protiteles IgA. V vseh prejetih vzorcih smo določali tudi prisotnost protiteles anti-IgA. Analiza rezultatov testiranj določanja prisotnosti protiteles IgA in anti-IgA je prikazana v Tabeli 1. V tabeli so predstavljene vrednosti preiskav in preiskovancev glede na število oseb, vključenih v testiranje, ter število vseh opravljenih testiranj IgA. Pri prvi skupini smo upoštevali podatek o koncentraciji protiteles IgA in prisotnosti protiteles anti-IgA v zadnjem prejetem vzorcu.

Pri 44-ih preiskovancih smo ugotovili popolno pomanjkanje protiteles IgA. Pri 45-ih preiskovancih smo določili vrednosti koncentracije protiteles IgA med 0,5 mg/L in 70 mg/L. V prvi skupini je bil delež oseb s prisotnimi protitelesi anti-IgA 27 %, v drugi pa 7 %.

Tabela 1: Analiza rezultatov testiranj določanja koncentracije protiteles IgA in prisotnosti protiteles anti-IgA na ZTM v letih od 2014 do 2024

število preiskav na ZTM v letih 2014-2024	skupno število preiskav	preiskovanci z normalnimi vrednostmi protiteles IgA		preiskovanci s pomanjkanjem protiteles IgA (IgA pod 70 mg/L)			
				preiskovanci s koncentracijo protiteles IgA manj kot 0,5 mg/L		preiskovanci s koncentracijo protiteles IgA med 0,5 in 70 mg/L	
		število	delež	število	delež	število	delež
število testiranj IgA (ob upoštevanju števila oseb in podatkov zadnjega prejetega vzorca)	194	105	54 %	44	23 %	45	23 %
... in prisotnimi protitelesi anti-IgA		/	0 % #	12	27 % #	3	7 % #
število testiranj IgA (ob upoštevanju vseh testiranj pri vsakem preiskovancu)	248	122	49 %	62	25 %	64	26 %
... in prisotnimi protitelesi anti-IgA		/	0 % #	17	27 % #	7	11 % #

#...preračunano glede na število oseb znotraj skupine

Pri treh pediatričnih preiskovancih z nizkimi koncentracijami IgA smo zaznali prisotna protitelesa anti-IgA. Od dveh preiskovancev (HT in RA) smo prejeli več vzorcev v različnih starostnih obdobjih. Pri osebi HT so koncentracije protiteles IgA v vzorcih blago naraščale. Pri osebi HT smo protitelesa anti-IgA zaznali v vzorcu, ki smo ga prejeli tri leta po prejemu prvega vzorca. Dinamiko titrov prikazuje Tabela 2. Tudi pri osebi RA smo dokazali protitelesa anti-IgA, hkrati pa pri vzorcih kasnejšega datuma odzema opazili padec koncentracije protiteles IgA pod 0,5 mg/L (Tabela 2).

Tabela 2: Spremljanje koncentracije protiteles IgA in pojava protiteles anti-IgA na primeru preiskovancev HT in RA.

Podatki o preiskovancu	Koncentracija protiteles IgA	Prisotnost protiteles anti-IgA	Titer protiteles anti-IgA
HT, starost 5 let in 8 mesecev, vzorec iz leta 2017	6 mg/L	niso prisotna	/
HT, starost 9 let in 8 mesecev, vzorec iz leta 2021	24 mg/L	SO prisotna	316
HT, starost 11 let in 3 mesecev, vzorec iz leta 2022	36 mg/L	SO prisotna	316
HT, starost 11 let in 8 mesecev, vzorec iz leta 2023	24 mg/L	SO prisotna	100
RA, starost 6 let, vzorec iz leta 2019	11 mg/L	SO prisotna	1000
RA, starost 7 let in 9 mesecev, vzorec iz leta 2020	3,5 mg/L	SO prisotna	316
RA, starost 9 let in 9 mesecev, vzorec iz leta 2022	< 0,5 mg/L	SO prisotna	316

Ugotavljanje razredov protiteles anti-IgA

Pri testiranju 24-ih vzorcev 15-ih preiskovancev s prisotnimi protitelesi anti-IgA nismo ugotovili prisotnost protiteles anti-IgA razreda IgE ali razreda IgM. Navedena ugotovitev je skladna s podatki iz literature, kjer omenjajo le teoretično možnost nastanka protiteles anti-IgA razreda IgE, ki pa ni bila podprta z dokazi.

Zaključek

- Na ZTM od leta 2014 določamo koncentracijo protiteles IgA in prisotnost protiteles anti-IgA. Delež preiskovancev s popolnim pomanjkanjem protiteles IgA je bil 23 % (IgA pod 0,5 mg/L) in kar 46 % s SIgAD (IgA pod 70 mg/L). V prvi skupini je bilo 27 % oseb s prisotnimi protitelesi anti-IgA, v drugi pa 17 %. Skupno število identificiranih oseb s prisotnimi protitelesi anti-IgA je 15.
- Za definicijo delnega pomanjkanja protiteles IgA (SIgAD) smo upoštevali diagnostično mejo, ki jo je postavilo Evropsko združenje za imunske pomanjkljivosti ESID (70 mg/L).
- Znotraj koncentracijskega območja protiteles IgA med 0,5 mg/L in 70 mg/L je bilo 45 preiskovancev. Identificirali smo 3 preiskovance s prisotnimi protitelesi anti-IgA, kar je 7 % preiskovancev. Pri dveh osebah smo opazili različen trend spreminjanja koncentracij protiteles IgA in titra protiteles anti-IgA.

- Nastala protitelesa anti-IgA pri nobenem od preiskovancev niso bila razredov IgE oziroma IgM.
- **Zaradi določitve protiteles anti-IgA pri osebah s SIgAD, priporočamo rutinsko ugotavljanje protiteles anti-IgA pri osebah s SIgAD.**

Literatura:

1. Brown R, Nelson M, Aklilu E, Kabani K, Yang S, Blayney B, et al. An evaluation of the DiaMed assays for immunoglobulin A antibodies (anti-IgA) and IgA deficiency. *Transfusion*. 2008;48(10):2057-9.
2. Rachid R, Castells M, Cunningham-Rundles C, Bonilla FA. Association of anti-IgA antibodies with adverse reactions to γ -globulin infusion. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(1):228-30.e1.
3. Seidel MG, Kindle G, Gathmann B, Quinti I, Buckland M, van Montfrans J, et al. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry Working Definitions for the Clinical Diagnosis of Inborn Errors of Immunity. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2019;7(6):1763-70.
4. Singh K, Chang C, Gershwin ME. IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2014;13(2):163-77.
5. Swain S, Selmi C, Gershwin ME, Teuber SS. The clinical implications of selective IgA deficiency. *Journal of translational autoimmunity*. 2019;2:100025.
6. Thibault L, Beauséjour A, de Grandmont MJ, Long A, Goldman M, Chevrier MC. Establishment of an immunoglobulin A-deficient blood donor registry with a simple in-house screening enzyme-linked immunosorbent assay. *Transfusion*. 2006;46(12):2115-21.
7. Yazdani R, Azizi G, Abolhassani H, Aghamohammadi A. Selective IgA Deficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Phenotype, Diagnosis, Prognosis and Management. *Scand J Immunol*. 2017;85(1):3-12.

Celice, tkiva in napredno zdravljenje v slovenski transfuzijski medicini 2024

Primož Rožman¹ in Dragoslav Domanović²

¹ Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

² European Blood Alliance, Amsterdam

primoz.rozman@ztm.si

Hiter razvoj celične terapije še naprej preseneča medicinsko in laično javnost. Če pomeni zdravljenje s celicami prenos lastnih ali tujih celic bolniku v medicinske namene, je transfuzija najstarejša poznana oblika celičnega zdravljenja. Na začetku je šlo seveda za **nadomestno zdravljenje** s celicami, ki se v telesu prejemnika ne razmnožujejo, kar se je (neuspešno) pričelo že s transfuzijo krvi v 15. stoletju, bolj uspešno pa nadaljevalo po odkritju krvnih skupin I. 1900. Zdravljenje s celicami, ki ohranijo tudi sposobnost razmnoževanja, se je pričelo po I. 1960 s presajanjem kostnega mozga in nadaljevalo s številnimi drugimi postopki. Priprava človeških celic namenjenih za zdravljenje, ki se v postopku minimalno spremenijo, je v začetku večinoma potekala v okviru transfuzijske medicine s pripravo in uporabo krvotvornih matičnih celic, granulocitov in limfocitov, nato se je razširila na mezenhimske matične celice, hondrocite, popkovnične, amnijske, reproduktivne in druge celice in tkiva. Vzporedno je potekal razvoj kriobiologije, nadzorovanega gojenja, razmnoževanja in usmerjene diferenciacije celic ter drugih metod celičnih manipulacij *in vitro*.

Snovi človeškega izvora in zdravila za napredno zdravljenje

Celične pripravke, ki so izhodiščni material za celično in tkivno terapijo ter napredna zdravljenja, pripravlja večinoma transfuzijska stroka in jih imenujejo **snovi človeškega izvora (SČI, angl. Substances of Human Origin - SoHO)**. Preskrbo s SČI, torej s krvjo, celicami in tkivi ter drugimi SČI, trenutno urejajo v nacionalno zakonodajo prenesene evropske direktive. V prihodnje bo to področje urejala nova skupna **Uredba EU o kakovosti in varnosti snovi človeškega izvora (SoHO)**, ki je v postopku sprejemanja¹.

V pripravi SČI za terapijo lahko somatske celice fenotipsko in celo gensko bistveno spremenimo, da dosežemo njihove zdravilne učinke. Če so celice podvržene manipulaciji, kot so npr. v primeru daljšega gojenja, aktivne manipulacije za zdravljenje raka (npr. celice CAR-T), ali genskih sprememb za zdravljenje dednih bolezni (npr. hemofilije, srpastocelične anemije, talasemije, itd.), jih uvrščamo med **zdravila za napredno zdravljenje (ZNZ)** (angl. Advanced Therapy Medicinal Products -ATMP). Ta zdravila lahko proizvajajo farmacevtska podjetja, ustanove za tkiva in celice, zdravstvene ustanove in druga javna in privatna podjetja, ki izpolnjujejo zakonske predpise za njihovo proizvodnjo².

Direktive predpisujejo, da se kri, celice in tkiva lahko pripravljajo v dveh vrstah ustanov – v transfuzijskih ustanovah (angl. Blood Establishments) ter v ustanovah za tkiva in celice (angl. Tissue Establishments). Tema dvema lahko podelijo zdravstvene oblasti (angl. Competent authorities) dovoljenje za delo in s tem pravice in dolžnosti preskrbe s SČI. Zakonodaja pri nas dovoljuje, da poteka preskrba s krvjo kot javna služba le v javnih zdravstvenih zavodih³, enako tudi preskrba s človeškimi celicami in tkivi, izjema pa je pridobivanje in uporaba avtolognih tkiv in celic, kar lahko opravljajo tudi druge pravne in fizične osebe⁴.

Transfuzijske ustanove so bile zaradi svoje zgodovinske povezanosti s celičnimi pripravki in infrastrukturo že od samega začetka primerno mesto za razvoj tako celičnega zdravljenja kot tudi naprednih zdravljenj, ker redno zagotavljajo vhodne materiale za raziskave in proizvodnjo ZNZ, vodijo registre darovalcev tkiv in celic, imajo obstoječe okvire kakovosti in sledljivosti, uvedeno logistiko, dobre proizvodne prakse, imunogenetske laboratorije, imajo pa tudi izobražen kader, prostore in potrebno opremo. Na področju naprednega zdravljenja se vse bolj uveljavlja tudi načelo personalizirane medicine, ki je tudi tradicionalni temelj transfuzijskega zdravljenja s komponentami krvi⁵. Znano je tudi, da so v preteklosti številne transfuzijske ustanove proizvajale zdravila iz plazme in medicinske pripomočke v lastnih frakcionažnih in drugih obratih (npr. Finska, Nizozemska). Tudi zato se transfuzijske ustanove lažje prilagodijo izpolnjevanju pogojev za pridobitev statusa ustanove za celice in tkiva ter dovoljenja za proizvodnjo ZNZ. Številni avtorji

zato pričakujejo nadaljevanje širitve in prodor naprednega zdravljenja v transfuzijskih ustanovah⁶, ki so tako postale centri naprednega zdravljenja⁷.

Zaradi omenjenega razvoja so nekatere države, kot npr. Združeno Kraljestvo, združile nacionalno oskrbo s krvjo, celicami, tkivi in celo organi kar v skupno, enovito službo - NHS Blood and Transplant (<https://www.nhsbt.nhs.uk/>). Podobno je tudi Ameriško združenje krvnih bank (AABB – American Association of Blood Banks) l. 2021 spremenilo svoje ime v AABB (Association for the Advancement of Blood & Biotherapies, <https://www.aabb.org/>), ki bolje odraža poslanstvo tega združenja.

Dovoljenja za proizvodnjo zdravil za napredno zdravljenje

Za izdelavo in uporabo ZNZ v EU je treba dandanes pridobiti dovoljenje za promet po centraliziranem postopku v skladu z Uredbo 1394/2007/ES⁸ in Uredbo 726/2004/ES⁹. Ta postopek je izjemno zahteven. Izjema so le t.im. **nerutinsko pripravljena ZNZ**, za pripravo katerih je potrebno le dovoljenje nacionalne agencije za zdravila. Nerutinsko pripravljena ZNZ se lahko pripravljajo tudi na samem mestu oskrbe (angl. **point-of-care-production**), kar ima določene prednosti, kot so fleksibilnost, individualen nadzor proizvodnje, možnost hitre izdelave izdelka za pacienta in možnosti inovacij, lastnih lečečemu zdravniku v okviru kliničnega preskušanja. Vendar je še večji problem v vprašljivi ponovljivosti tega postopka, saj morajo različne ustanove proizvesti standarden izdelek, ki izpolnjuje natančno določene specifikacije. To je še posebno težko oz. praktično nemogoče zagotoviti pri zapletenih postopkih kot so celične in genske terapije. Sicer pri tem do neke mere lahko pomaga visoka stopnja avtomatizacije, kar smo videli pri avtomatizaciji tehnologije za manipulacijo celic CAR-T (sistem CliniMACS Prodigy). Te avtomatizirane naprave v bistvu odstranijo vse odprte korake v ročni metodologiji in omogočajo, da zagotovimo, da so vsi izdelki izdelani enako. Drug velik problem je tudi dobava vektorjev za gensko manipulacijo, saj niso široko dostopni. In daleč največji problem je, da mora imeti ustanova, ki proizvaja te izdelke, tudi vse ustrezajoče čiste prostore, sisteme kakovosti, opremo in osebje¹⁰ ter predvsem izjemno storilno administrativno podporo.

Etični pogledi na snovi človeškega izvora in napredna zdravljenja

Darovana človeška kri, celice in tkiva so snovi človeškega izvora in so dobrine splošnega družbenega pomena. Oskrba z njimi je v javnem interesu, pri čemer ne gre za komercialno blago, temveč za **javno dobro**, ki je namenjeno splošni in enakopravni rabi državljanov. Pri tem je raba svobodna in načeloma pod enakimi pogoji in prav zato nihče ne sme javnega dobra uporabljati tako, da druge izključi iz enake rabe oziroma da jim bistveno oteži uporabo. Zato mora pri preskrbi s krvjo in drugimi SČI nacionalni interes prevladati nad lokalnim^{11,12}. Sodobna preskrba s krvjo in ostalimi SČI temelji tudi na globalnih načelih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO), to je na neplačanem prostovoljnem solidarnem darovanju in nacionalni samozadostnosti. To pomeni, da je treba človeške celice ali tkiva pridobivati od prostovoljnih neplačanih darovalcev ne le za zdravljenje s celicami in tkivi, temveč tudi, ko se uporabljajo kot izhodiščni material za ZNZ.

Razvoj zdravljenja s celicami, tkivi in ZNZ odpira poleg številnih možnosti tudi pasti, kot je na primer neučinkovita raba virov in opreme. Tipičen primer take situacije na področju SČI je slovenska transfuzijska mreža, ki je trenutno neenotna in neracionalna. Že davnega leta 2000 je bil sklenjen dogovor o oblikovanju enovite »Transfuzijske službe Slovenije«¹³. Proces se je odvil samo do polovice in je leta 2009 zastal brez vsakršne razlage, ostale so tri popolnoma ločene ustanove (Ljubljana, Celje, Maribor). Za razliko je dandanes transfuzijska služba v večini EU držav enovita in centralizirana, kar bistveno prispeva h kakovosti in varnosti, k racionalizaciji poslovanja in izkoriščanju ekonomije obsega, kot tudi k optimalni uporabi SČI. Vendar je področje ZNZ v Evropi še dosti manj urejeno kot področje transfuzijske oskrbe, saj je popolnoma liberalizirano in zato prihaja do podobnega podvojevanja, kompeticije tržnega tipa med javnimi in zasebnimi ustanovami in popolne nepreglednosti tudi pri razvoju bioterapij in naprednega celičnega zdravljenja.

Stanje v Sloveniji

Podobno je v Sloveniji, kjer je ZTM je trenutno edina javna institucija z dovoljenjem za proizvodnjo ZNZ, poleg nje pa proizvaja ZNZ tudi nekaj drugih privatnih ustanov, ustanovljajo pa se tudi nekatere nove, in to iz javnih sredstev, kar podvojujejo dejavnost ZTM-ja, ki je trenutno edina pooblaščenca institucija za obe dejavnosti - transfuzijsko in tkivno-celično. Kot Ustanova za tkiva in celice ima ZTM dolgoletne izkušnje na področjih preskrbe s celicami in tkivi ter naprednega zdravljenja. V zadnjih 30 letih je ZTM razvil različna napredna zdravljenja, celične terapije, tkivno inženirstvo, banke celic in tkiv, transplantacijsko dejavnost z odvzemom in obdelavo matičnih celic, mednarodni register nesorodnih darovalcev kostnega mozga SlovenijaDonor, laboratorije za tipizacijo tkiv ter še nekatera druga področja SČI ter naprednega zdravljenja, ki jih je tudi pomagal zakonsko urediti in jih danes izvaja po mednarodnih navodilih in standardih¹⁴. S tem je pridobil tudi vse zahtevane mednarodne akreditacije (ISO9002, EFI, JACIE, itd.). Uspeh je tudi nedavna pridobitev certifikata GMP (dobre proizvodne prakse) za pripravo ZNZ¹⁵.

Ti uspehi v zadnjih 20 letih niso bili slučajni, temveč so plod prizadevanj, dolgoletne vizije, znanstvenih raziskav in vlaganja v razvoj. V tem obdobju so naše tri raziskovalne skupine sodelovale v številnih nacionalnih in mednarodnih raziskovalnih projektih naprednega zdravljenja¹⁶. To potrjujejo tudi naše številne publikacije, saj so avtorji iz ZTM v tem času objavili okrog **1365 bibliografskih enot**, od tega **268 znanstvenih člankov** v zahtevnih mednarodnih znanstvenih revijah; več kot polovica teh člankov je s področja naprednega zdravljenja¹⁷.

Spričo tega je kar težko razumeti, zakaj si nekateri kritiki brez izkušenj in referenc s tega področja ZTM-ju oporekajo strokovnost z raznimi (napačnimi) izgovori o cenah krvi in ob podpori nekaterih medijev¹⁸⁻²⁰. Pri natančni analizi vzrokov se hitro pokaže, da gre le za tlakovanje lokalnih interesov in neutemeljeno diskvalifikacijo z namenom ustanovitve novega centra za proizvodnjo ZNZ in centra za aferezo in kriobiologijo pri UKC, poleg že obstoječih na ZTM. Pri vsem tem na škodo bolnikov in javnega zdravstva nastajajo večletne zamude pri uvajanju priprave ZNZ v Sloveniji. Še manj razumljivo pa je, da se lahko pri nas javna sredstva investirajo v infrastrukturo in in kadre, **ki že obstajajo v okviru javne mreže.**

Naša javna zdravstvena sredstva so omejena. Zato za začetek potrebujemo jasno strategijo oblikovanja mreže javnih ustanov za celice in tkiva ter napredna zdravljenja, pri čemer je javna sredstva za ta namen smiselno in gospodarno usmeriti v ustanove, ki že imajo vso ustrezno infrastrukturo, kadre in know-how. Poleg tega je potrebno sprostiti tudi vso možno privatno iniciativo in ji omogočiti vlaganja v programe naprednega zdravljenja. Še posebno pa je potrebno učvrstiti sodelovanje med izdelovalci in kliničnimi uporabniki ZNZ, ki je v Sloveniji dolga leta odlično delovalo, stimulirati raziskovanje novih načinov celičnega zdravljenja in nerutinsko pripravo ZNZ, njihovo uporabo pa enakopravno zagotoviti vsem večjim zdravstvenim centrom v Sloveniji.

Zaključek

Avtorja meniva, da sta v Sloveniji kljub navidezni zakonski pokritosti tako program preskrbe s krvjo kot tudi program preskrbe s celicami in tkivi ter naprednim zdravljenjem pomanjkljiva. Stroka se je namreč razvijala hitreje kot pa državna administracija, ki ji mogla slediti. Zato je potrebno oba programa smiselno dograditi. To v praksi pomeni, da je poleg priprave dokumenta **»Nacionalna politika preskrbe s krvjo in zdravili iz krvi«** potrebno zagotoviti tudi dokument **»Nacionalna politika preskrbe s celicami, tkivi in naprednim zdravljenjem«**, ki mora vsebovati uradno stališče države o ključnih organizacijskih, finančnih, tehničnih in pravnih aspektih te preskrbe. Pri oblikovanju nacionalne politike morajo sodelovati vsi deležniki ob koordinaciji Ministrstva za zdravje, ki mora ta dokument sprejeti, zagotoviti in tudi nadzorovati izvajanje teh dejavnosti.

Bolniki in davkoplachevalci v Sloveniji zaslužijo sodobno zdravljenje s človeško krvjo, celicami in tkivi ter ZNZ - vedno kadar ga potrebujejo. Pri zagotavljanju tega standarda v javni zdravstveni mreži je smotno in zato potrebno upoštevati na državni ravni usklajene principe racionalizacije, integracije kadrov, znanja, opreme in ostalih resursov in ne dovoljevati neracionalne dejavnosti glede na lokalne interese.

Članek je osebno mnenje avtorjev in ne odraža nujno uradnega mnenja institucij.

Literatura

1. UREDBA (ES) št. 1394/2007 EVROPSKEGA PARLAMENTA IN SVETA z dne 13. novembra 2007 o zdravilih za napredno zdravljenje ter o spremembi Direktive 2001/83/ES in Uredbe (ES) št. 726/2004
2. European Medicines Agency (EMA): Advanced therapy medicinal products: Overview. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/advanced-therapy-medicinal-products-overview>
3. Zakon o preskrbi s krvjo (ZPKrv-1). Uradni list RS, št. 104/06
4. Zakon o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje (ZKVČTC). Uradni list RS, št. 61/07 in 56/15 – ZPPDČT
5. Rožman Primož. Transfuzijska medicina na razpotju med personalizirano in depersonalizirano medicino. V: Knjiga povzetkov. [2012], str. 126. Knjiga povzetkov. 4. Kongres hematologov in transfuziologov Slovenije z mednarodno udeležbo Terme Olimia, Podčetrtek 12.-14.april 2012. Str 126
6. Horan A., Sarreth S., Tor H.W., Waters A. The expanding role of blood and tissue establishments in the development of advanced therapy medicinal products. *Cytotherapy* 00 (2024)1 -7.
7. Bönig Halvard, Feliciano Rich, Galea George, Homburg Keld, Rožman Primož, Weitekamp Lee Ann, Seifried Erhard. The role of blood establishments in cellular therapies: scope of activities. V: Folléa, Gilles (ur.). *Blood, tissues, and cells from human origin: the European Blood Alliance perspective*. Amsterdam: European Blood Alliance (EBA), cop. 2013., str. 255-275.
8. Uredba (ES) št. 1394/2007 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 13. novembra 2007 o zdravilih za napredno zdravljenje ter o spremembi Direktive 2001/83/ES in Uredbe (ES) št. 726/2004
9. Uredba (ES) št. 726/2004 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 31. marca 2004 o postopkih Skupnosti za pridobitev dovoljenja za promet in nadzor zdravil za humano in veterinarsko uporabo ter o ustanovitvi Evropske agencije za zdravila
10. Improving access to cell and gene therapies with a point-of-care approach. *A Point-of-Care Approach to Cell Therapy Manufacturing - RegMedNet*
11. Stiglitz, J. 1988. *The economics of the public sector*, 2nd edition. New York: Norton.
12. Stanovnik T. *Javne finance*. Učbenik. 1998. Ekonomska fakulteta Ljubljana, ISBN 978-961-240-252-5)
13. ROŽMAN, Primož, DOMANOVIČ, Dragoslav. Transfusion medicine in Slovenia - current status and future challenges. *Transfus. med. hemother.* (Print), 2006, letn. 33, str. 420-426. [COBISS.SI-ID 23014361]

14. Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application.
<https://www.edqm.eu/en/guide-to-the-quality-and-safety-of-tissues-and-cells-for-human-application1>
15. Urban Švajger, Primož Poženeš. ZTM zagotavlja zdravila za napredno zdravljenje. Revija ISIS,18: marec 2024;18-19.
16. SICRIS. (<https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/organization/617>).
17. COBISS Kooperativni online bibliografski sistem in servisi COBISS.
https://bib.cobiss.net/bibliographies/si/webBiblio/bib351_20240320_172258_0311.html).
18. Samo Zver. V čigavem imenu je kri? JAVNO PISMO. Mladina 03/19.1.2024; 64-47.
19. Tina Nika Snoj. Kri in grožnje. JANA, 6.2.2024: 41-42.
20. Brigite Ferlič Žgajnar. Grožnja hematološki in transplantacijski dejavnosti. Delo 24.1.2024;4.

Konstelacija eritrocitnih antigenov pri bolnikih zdravljenih z daratumumabom

Franka Erker¹, Sanja Sobočan Koša¹

¹Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM)

franka.erker@ztm.si

UVOD

Daratumumab je terapevtsko človeško monoklonsko protitelo, ki je usmerjeno proti transmembranskemu glikoproteinu CD38. V prvi vrsti se uporablja za zdravljenje diseminiranega plazmocitoma (DP), ki na tumorsko spremenjenih plazmatkah prekomerno izraža glikoprotein CD38. Daratumumab z vezavo na tarčno mesto močno zavira razmnoževanje tumorskih celic. Glikoprotein CD38 se sicer nahaja na površini imunskih celic tako limfoidne kot mieloidne vrste, eritrocitih in nekaterih drugih tkivih.

Bolniki z DP nemalokrat potrebujejo transfuzijsko zdravljenje. Osnova za izdajo krvnih komponent bolniku je izvid predtransfuzijskih preiskav. Znano je, da terapija z daratumumabom moti določene predtransfuzijske preiskave. V vzorcu krvi bolnika prisotna monoklonska protitelesa anti-CD38 se *in vitro* vežejo na glikoprotein CD38 izražen na eritrocitih bolnika, krvodajalca in testnih reagenčnih eritrocitih. Ob dodatku antihumanega globulina oz. Coombsovega reagenta pride do interference terapije, ki daje pozitiven rezultat direktnega Coombsovega testa (DCT) pri bolniku, panreaktiven rezultat presejalnega testiranja na prisotnost eritrocitnih protiteles ali indirektnega Coombsovega testa (ICT) in navzkrižnega preizkusa (NP).

Za varno transfuzijo bolnikom zdravljenim z daratumumabom moramo z nadaljnjo serološko diagnostiko izključiti morebitna spodaj ležeča aloprotitelesa ter določiti razširjen fenotip najpogostejših klinično pomembnih antigenov. Na Centru za imunoematologijo Zavoda RS za transfuzijsko medicino interferenco z daratumumabom izničimo z obdelavo testnih eritrocitov z ditiotreitolom (DTT) ali nevtralizacijo plazme s substanco topnega rekombinantnega glikoproteina CD38 (tr CD38). Nadaljnja serološka diagnostika je relativno zahtevna in dolgotrajna, v primeru uporabe tr CD38 pa tudi draga. Tako velikokrat v primeru nujnega naročila za kri bolniku

zagotovimo razširjeno antigensko skladne enote v klinično najpomembnejših antigenih s pozitivnimi rezultati seroloških testiranj. Interferenca terapije s predtransfuzijskimi preiskavami lahko vztraja tudi do 6 mesecev po ukinitvi.

NAMEN

V vsakdanji praksi včasih ne moremo takoj zagotoviti razširjeno antigensko skladnih enot bolnikom zdravljenim z daratumumabom. V teh primerih je nadaljnja diagnostika za izključitev aloprotiteles ključnega pomena.

Namen prispevka je bil določiti konstelacijo klinično najpomembnejših eritrocitnih antigenov pri bolnikih zdravljenih z daratumumabom ter podatke primerjati z antigensko konstelacijo v splošni populaciji, zaradi ocene možnosti zagotavljanja antigensko skladnih enot eritrocitov.

Obenem smo analizirali delež aloimunizacij na klinično najpomembnejše in najpogostejše eritrocitne antigene med omenjenimi bolniki, zaradi ocene nevarnosti nemožnosti takojšnje izključitve aloprotiteles ob interferenci terapije in posledično grozeče hemolitične transfuzijske reakcije.

METODE

S pomočjo lokalnega transfuzijskega informacijskega sistema (IS) DATEC/LAST smo zbrali podatke bolnikov na terapiji z daratumumabom, ki smo jih obravnavali v sklopu naročila za predtransfuzijske preiskave ob pripravi ustreznih enot eritrocitov.

Vsem obravnavanim bolnikom smo z metodo aglutinacije na ploščici/v epruveti in na gelski kartici določili krvno skupino ABO, RhD, K ter razširjen fenotip ostalih klinično najpomembnejših antigenov: fenotip Rh (C, c, E, e), Fy (a, b), Jk (a, b), M, S, s. Slednje smo določili serološko oz., kadar to ni bilo možno, z genotipizacijo. Dodatno smo opravili DCT in ICT ter po potrebi specifikacijo eritrocitnih protiteles.

REZULTATI

Do februarja letošnjega leta 2024 smo na Centru za imunohematologijo obravnavali 160 aktivnih bolnikov z DP zdravljenih z daratumumabom.

Pregled najpogostejših klinično pomembnih eritrocitnih antigenov

V spodnji tabeli (**Tabela 1**) je prikazana konstelacija klinično najpomembnejših eritrocitnih antigenov med omenjenimi bolniki, primerjaje s konstelacijo klinično najpomembnejših eritrocitnih antigenov v zdravi populaciji slovenskih krvodajalcev ter v zdravi populaciji belcev.

Krvnoskupinski sistem	Eritrocitni antigeni	Delež POZ med bolniki, ki prejema daratumumab (%)	Delež POZ v zdravi populaciji slovenskih krvodajalcev ¹ (%)	Delež POZ v zdravi populaciji belcev ² (%)
ABO	O	33	38	44
	A	41	40	43
	B	19	15	9
	AB	7	7	4
Rh	D	86	85	85
	C	74	66	68
	E	26	25	29
	c	78	79	80
	e	97,5	97	98
Kell	K	9	9	9
Duffy	Fy(a)	65	67	66
	Fy(b)	77,5	79	83
Kidd	Jk(a)	71	75	76
	Jk(b)	81	74	73
MNS	M	88	83	78
	S	61	56	55
	s	85	87	89

Tabela 1: Konstelacija klinično najpomembnejših eritrocitnih antigenov med bolniki zdravljenimi z daratumumabom, v zdravi populaciji slovenskih krvodajalcev⁶ ter v zdravi populaciji belcev⁷.

⁶ Podatki povzeti po prispevku Prevalenca eritrocitnih antigenov med krvodajalci Zavoda RS za transfuzijsko medicino (A. Rakušček), objavljenem v Zborniku predavanj strokovnih srečanj Združenja za transfuzijsko medicino Slovenije v letu 2016; po publikaciji Življenje teče dalje: Poročilo o transfuzijski dejavnosti v Sloveniji med epidemijo covid-19 (2020-2021); ter po diplomskem delu Razširjenost Rh fenotipa krvodajalcev v severovzhodni Sloveniji (A. Cvetko).

⁷ Podatki povzeti po učbeniku Blood Groups and Red Cell Antigens (L. Dean.).

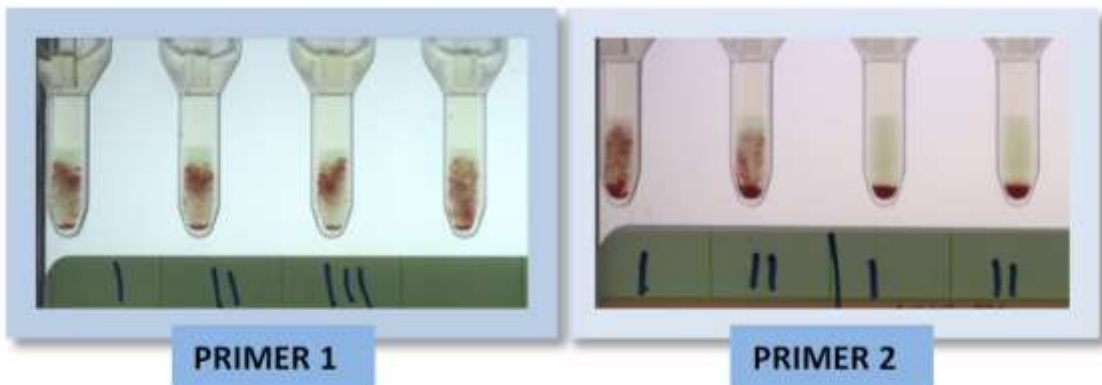
Pregled deleža aloimunizacij med bolniki zdravljenimi z daratumumabom

Pri pregledu deleža pozitivnih rezultatov ICT med bolniki zdravljenimi z daratumumabom smo odkrili 19 bolnikov, kar predstavlja 11,9 % (19/160) vseh obravnavanih. Od tega smo klinično pomembna protitelesa dokazali le pri 3,15 % (5/160) obravnavanih bolnikov. Podatek je primerljiv s podatki iz literature, po katerih je delež aloimunizacij pri bolnikih s hematološkim rakom ocenjen na 2,8 %.

RAZPRAVA

Iz zbranih podatkov ugotavljamo, da je med obravnavanimi bolniki delež zastopanosti krvne skupine O nekoliko nižji in skupine B nekoliko višji kot v zdravi populaciji. Antigen C je nekoliko bolj zastopan med obravnavanimi bolniki kot v zdravi populaciji. Antigen Fy(b) je nekoliko manj zastopan v slovenski populaciji, tako bolnikov kot krvodajalcev. Delež Jk(b+) bolnikov je višji in Jk(a+) nižji kot v zdravi populaciji. Antigen M je bolj zastopan v slovenski populaciji, tako bolnikov kot krvodajalcev. Delež S+ bolnikov je nekoliko višji kot v zdravi populaciji. Pri ostalih antigenih nismo beležili odstopanj.

Med petimi aloimuniziranimi bolniki smo odkrili aloprotitelesa specifičnosti anti-E pri enem bolniku, anti-Cw pri dveh bolnikih, anti-Cw ter anti-Jk(a) pri enem bolniku ter samo anti-Jk(a) pri enem bolniku. Delež bolnikov s pozitivnim ICT in nerazvidno specifičnostjo protiteles je bila 5,6 % (9/160). V primeru slednjih je lahko šlo za protitelesa v nastajanju, protitelesa anti-HLA I. razreda ali zgolj nespecifično reaktivnost. Pri 3,15 % (5/160) bolnikov smo zaznali zgolj avtoprotitelesa.



Slika 1: Primer 1 prikazuje panreaktiven rezultat ICT in NP zaradi interference daratumumaba. Primer 2 prikazuje ICT pred in po obdelavi z DTT.

ZAKLJUČKI

Zdravilo daratumumab, ki se uporablja za zdravljenje diseminiranega plazmocitoma, predstavlja izziv transfuzijski službi, saj z vplivom na predtransfuzijsko testiranje otežuje izključevanje prisotnosti morebitnih aloprotiteles v bolnikovi plazmi. Pri bolnikih, ki prejemajo omenjeno zdravilo, skušamo zagotoviti varno transfuzijo z izničitvijo interference z obdelavo testnih eritrocitov z DTT ali nevtralizacijo plazme s substanco tr CD38. Obenem bolnikom zagotavljamo razširjeno antigensko skladne enote eritrocitov.

Glede na zbrane podatke je konstelacija najpogostejših klinično pomembnih eritrocitnih antigenov pri bolnikih na terapiji z daratumumabom nekoliko odstopajoča v antigenih C, Jk(a), Jk(b), M in S ter primerljiva v ostalih antigenih. Glede na malenkostno odstopanje imamo v Sloveniji, ob dobrih zalogah krvi, dobre zmožnosti zagotavljanja razširjeno antigensko skladnih enot eritrocitov za omenjene bolnike. Prav tako imamo dobro izdelane poti za zbiranje krvi antigensko skladnih dajalcev.

Delež aloimunizacij med bolniki zdravljenimi z daratumumabom je bil primerljiv z deležem aloimunizacij pri ostalih bolnikih s hematološkimi raki. Kljub temu svetujemo pravočasno naročanje krvi ter razširjeno predtransfuzijsko diagnostiko za izključitev morebitnih aloprotiteles in pripravo ustreznih enot eritrocitov.

LITERATURA

1. Cah Rakušček A. Prevalenca eritrocitnih antigenov med krvodajalci Zavoda RS za transfuzijsko medicino. In: Levičnik Stezinar S, ur. Zbornik predavanj strokovnih srečanj Združenja za transfuzijsko medicino Slovenije v letu 2016; V Ljubljani: Slovensko zdravniško društvo; 2016. p. 100-102
2. Cvetko A. Razširjenost Rh fenotipa krvodajalcev v severovzhodni Sloveniji. [Graduation Thesis]. Maribor: A. Cvetko; 2010. p. 31
3. Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US); 2005 [cited 2024 Mar 15] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2267/>
4. Tauscher C, Moldenhauer S, Bryant S, DiGuardo M, Jacob EK. Antibody incidence and red blood cell transfusions in patients on daratumumab. *Transfusion*. 2021 Dec;61(12):3468-3472.
5. Chinoca Ziza KN, Paiva TA, Mota SR, Dezan MR, Schmidt LC, Brunetta DM, et al. A blockage monoclonal antibody protocol as an alternative strategy to avoid anti-CD38 interference in immunohematological testing. *Transfusion*. 2019 May;59(5):1827-1835.

Upravljanje sledljivosti komponent krvi v Transfuzijskem centru Splošne bolnišnice Celje

Mateja Gjerkeš Tratar, Bojana Kotnik

Transfuzijski center, Splošna bolnišnica Celje

mateja.gjerkes-tratar@sb-celje.si

Uvod

Po zakonu o preskrbi s krvjo (Uradni list RS, št. 104/06) mora Transfuzijski zavod ali transfuzijski center sprejeti vse potrebne ukrepe, ki zagotavljajo, da je mogoče kri in komponente krvi, ki se zbirajo, testirajo, predelujejo, shranjujejo in razdeljujejo v Republiki Sloveniji, slediti od krvodajalca do prejemnika in obratno. Po Pravilniku o hemovigilanci (Uradni list RS, št. 104/06) mora Transfuzijski zavod, transfuzijski center ali bolnišnična krvna banka ob izdaji enot krvi ali komponent krvi za transfuzijo preveriti, da je bila vsaka izdana enota krvi ali komponenta krvi uporabljena za transfuzijo prejemniku, kateremu je bila namenjena, ali da je bila odstranjena, če ni bila uporabljena za transfuzijo.

Namen

Zagotavljanje sledljivosti vsake posamezne enote krvi ali komponente krvi od krvodajalca do končnega uporabnika.

Materiali in metode

V Transfuzijskem centru Celje (TC) v sodelovanju z oddelki Splošne bolnišnice Celje (SBC) spremljamo podatke o izdanih in transfundiranih komponentah krvi. Vsako izdano komponento krvi spremlja Izdajnica, ki jo v TC pripravimo v informacijski sistem (IS) Datec. Ob transfundiranju komponente krvi, na oddelku izpolnijo Transfuzijski list. Oddelki SBC morajo mesečno vračati Izdajnice in kopije Transfuzijskih listov v TC, zato imajo na vsakem oddelku osebo, ki je zadolžena za vračanje. Dokumentacijo pošilja pooblaščenim osebam v TC, ki je zadolžena za analizo izdanih

komponent krvi za določen oddelek. Pooblaščen oseb TC za posamezni oddelek pripravi podatke o skupnem številu izdanih komponent krvi za pretekli mesec, o številu vseh vrnjenih kopij Transfuzijskih listov in izračuna delež nevrnjenih. Številke vrnjenih Izdajnic ponovno vnese v IS Datec ter izračuna delež nevrnjenih Izdajnic za posamezni oddelek. Ko so zbrani podatki za vse oddelke, pooblaščen oseb za hemovigilanco v TC izračuna delež nevpisanih Izdajnic in delež nevrnjenih kopij Transfuzijskih listov za vse oddelke SBC. Podatke analiziramo mesečno in letno. Oddelke obveščamo o njihovi uspešnosti ter jih opozarjamo na dosledno vračanje Izdajnic in kopij Transfuzijskih listov. Rezultate prav tako obravnavamo na sestankih Bolnišničnega transfuzijskega odbora. Za zaposlene SBC redno organiziramo izobraževanja s področja transfuzijske medicine.

Rezultati

Med letoma 2012 in 2019 smo z dobrim sodelovanjem z oddelki SBC uspešno zmanjševali delež nevpisanih Izdajnic in nevrnjenih kopij Transfuzijskih listov. V letih 2020 in 2021, ki sta bili zaznamovani z epidemijo koronavirusa, sta se deleža opazno povečala. To je bilo posledica pogostih selitev bolnikov, pomanjkanja kadra, časovne stiske, dela v zaščitni opremi in shranjevanja potencialno kužne dokumentacije v zaščitnih folijah. Glede na zahtevne razmere dela v tem obdobju je bil slabši rezultat pričakovan. Od leta 2022 dalje opažamo ponovni upad deleža nevpisanih Izdajnic in nevrnjenih kopij Transfuzijskih listov.

Zaključek

Dosledno spremljanje vsake posamezne komponente krvi od krvodajalca do bolnika je ključnega pomena za zagotavljanje varnosti transfuzije. Rezultati naše analize kažejo, da smo s tesnim sodelovanjem z oddelki Splošne bolnišnice Celje med letoma 2012 in 2019 uspešno zmanjševali delež nevpisanih Izdajnic in nevrnjenih kopij Transfuzijskih listov. V obdobju epidemije koronavirusa, v letih 2020 in 2021, smo zaznali začasen porast teh deležev, od leta 2022 dalje pa opažamo ponovni upad, kar kaže na uspešno obvladovanje izzivov. Pomembno je, da nadaljujemo s tem trendom, saj to neposredno prispeva k varnosti in kakovosti transfuzijske oskrbe naših bolnikov.

Delovanje Centra za transfuzijsko dejavnost Izola na področju preskrbe s krvjo

Tanja Grandi, Mirjana Mikša, Sara Močnik, Matjaž Poniž

Zavod RS za transfuzijsko medicino

tanja.grandic@ztm.si

Transfuzijska dejavnost ima na Primorskem dolgo tradicijo. Začetki segajo v leto 1961, ko je bil pri Splošni bolnici Koper ustanovljena Transfuzijska postaja. Center za transfuzijsko dejavnost Izola (CTD IZ) deluje v sklopu Zavoda RS za transfuzijsko medicino od leta 2009 na lokaciji Splošne bolnišnice Izola. Pri delu s krvodajalci vsa leta zelo dobro sodelujemo s sodelavci Organizacije Rdečega križa (OZRK), Študentsko organizacijo Univerze na Primorskem, osnovnimi in srednjimi šolami ter drugimi podjetji oziroma društvi.

V prispevku bomo predstavili način dela in rezultate zadnjih 10 let ter posodobljen način prijave na krvodajalsko akcijo.

V letih od 2014 do 2023 se je število sprejemov gibalo okrog 5400, pri čemer je bilo v prvem letu pandemije COVID (2020) število sprejemov nekoliko manjše, in sicer 4985. Nato se je število sprejemov in posledično odvzemov vseskozi povečevalo. Čeprav je bilo med samo pandemijo gibanje omejeno, so se krvodajalci vselej dobro odzvali na vabila OZRK. Temu je botroval nov način naročanja, ki poteka tako, da krvodajalec pokliče po telefonu na CTD Izola, kjer ga osebje povpraša o glede potovanj, splošnega zdravja, zdravja domačih in na delovnem mestu, jemanja zdravil, tetovaž, ugrizov klopotov, krvni skupini itd. ter ga vpiše na seznam na točno določen dan in uro. Krvodajalec tako hitreje opravi cel postopek in si lažje načrtuje druge obveznosti. Poleg tega beležimo relativno nizek delež odklonov (v vseh letih od 6 % do 9 %). CTD IZ pridobi približno 10 % enot polne krvi več kot pa izda koncentriranih eritrocitov za štiri bolnišnice na Obali, in sicer Splošno bolnišnico Izola, Ortopedsko bolnišnico Valdoltra, MC Medicor in Bolnišnico Sežana.

Bistvo novega načina naročanja je dobra komunikacija med osebjem na CTD IZ in krvodajalci. Za pripravo seznamov in komuniciranje je potrebno več časa in boljša organizacija saj krvodajalec ne

more vedeti ali osebje na CTD IZ ravno rešuje življenje nekemu pacientu tako, da pripravlja ustrezno krvno komponento. Za dobro dostopnost in odzivnost se vselej zelo zavzamemo. Poleg odličnega sodelovanja s samimi krvodajalci bi izpostavili izjemno sodelovanje z osebjem na OZRK. OZRK povabi krvodajalce bodisi preko pošiljanja SMS sporočil bodisi neposredno s telefonskim klicem krvodajalcem. Osebni stik se je izkazal za boljšega in iz pogovorov s krvodajalci lahko razberemo, da jim je tak način komuniciranja ljubši.

Na primeru OZRK Koper smo analizirali, koliko krvodajalcev je potrebno poklicati (osebno po telefonu), da je odziv dober in lahko zagotovimo ustrezno število krvodajalcev z želeno krvno skupino. V letu 2023 so sodelavci OZRK Koper poklicali 516 krvodajalcev (9,4% vseh sprejemov). Na poziv se je pozitivno odzvalo 200 krvodajalcev (38,8 % poklicanih) z želeno krvno skupino. OZRK je bil uspešen pri klicanju v 86,2 % saj je za potrebnih 232 enot uspešno pridobil 200 krvodajalcev.

Opažamo, da se je v zadnjih desetih letih, in še posebej med oziroma po pandemiji COVID, način komuniciranja s krvodajalci spremenil. Čeprav imamo vseskozi zelo dober način komunikacije, je potrebno slednjo vzdrževati. Hvaležni smo OZRK-jem in se zavedamo, da brez dobrega sodelovanja vseh deležnikov ne bi mogli zagotavljati planiranih ciljev.

Analiza števila sprejemov in odklonov krvodajalcev med leti 2009-2023

Erika Kavaš, Nataša Harkai

Center za transfuzijsko medicino, Univerzitetni klinični center Maribor, Slovenija

erika.kavas@ukc-mb.si

Uvod. V procesu zbiranja krvi zbiramo podatke o sprejemu, odvzemu in odklonu novih in rednih krvodajalcev. Spremljamo tudi kazalce učinkovitosti in uspešnosti. V našem centru smo si zastavili cilj za delež odklonov pod 11% pri starih krvodajalcih in pod 25% pri novih krvodajalcih.

Namen. V zadnjem 15 letnem obdobju smo primerjali odziv krvodajalcev in kazalnike kakovosti za proces zbiranja krvi, da bi pri njih ugotovili trend spreminjanja.

Material in metode. Analizirali smo podatke iz letnih poročil v obdobju od leta 2009 do leta 2023. Podatke o odklonih smo primerjali z našimi kazalci učinkovitosti in uspešnosti ter po obdobjih preverili deleže vzrokov odklona. Prikazali smo deleže objektivnih vzrokov odklona, ki so najpogostejši, v primerjavi z drugimi opredeljenimi vzroki odklona. Podatke o vzroku odklonov smo pridobili iz IS Datec.

Rezultati.

Tabela 1: Statistika prijavljenih in odklonjenih krvodajalcev v obdobju med 2009 in 2023

Leto	Število sprejemov	Število novih krvodajalcev	Število odklonjenih
2009	14726	2409	1504
2010	15121	2415	1591
2011	15741	2396	1789
2012	14823	1939	1851
2013	15195	2194	1845
2014	15377	2293	1846
2015	14948	2001	1692
2016	15236	2112	1924
2017	15070	1893	2296
2018	14272	1792	1879
2019	14457	1665	2327
2020	12806	1192	1639
2021	13472	985	1368
2022	13573	1172	1454
2023	14501	1424	1559

Tabela 2: Kazalci učinkovitosti in uspešnosti v obdobju med 2009 in 2023

Leto	<i>Delež rednih krvodajalcev (%)</i>	<i>Delež novih krvodajalcev (%)</i>	<i>Delež odklona (%)</i>	<i>Odklon pri rednih krvodajalcih (%)</i>	<i>Odklon pri novih krvodajalcih (%)</i>
2009	83,63	16,36	10,21	8,27	21,94
2010	84,03	15,97	10,52	8,48	21,24
2011	84,78	15,22	11,36	9,11	23,92
2012	86,91	13,08	12,49	10,12	28,19
2013	85,56	14,44	12,14	10,01	24,70
2014	85,09	14,91	12,00	9,50	26,30
2015	86,61	13,39	11,32	9,48	23,24
2016	86,14	13,86	12,63	10,09	28,41
2017	87,44	12,56	15,24	12,70	32,86
2018	87,44	12,56	13,17	10,81	29,58
2019	88,48	11,52	16,10	17,75	35,86
2020	90,69	9,31	12,80	10,87	31,63
2021	92,69	7,31	10,15	9,27	21,42
2022	91,36	8,64	10,71	9,56	22,87
2023	90,18	9,82	10,75	9,14	25,50

Iz Tabele 2 je razvidno da je bilo leta 2009 16,36% novih krvodajalcev, leta 2023 pa je delež padel na le 9,82 %, kar je najverjetneje tudi posledica po covidnem času, ko zaradi načina šolanja in omejitve druženja, ni bilo mogoče skupinsko organizirati mladih krvodajalcev.

V obdobju od leta 2009 do 2015 smo realizirali cilj pri številu odklonjenih rednih in novih krvodajalcev. Pogosti in objektivni vzroki za odklon krvodajalca (hemoglobin, krvni pritisk in srčni utrip) predstavljajo 43,6% celokupnega števila odklonov.

Zastavljeni cilj odklonov pri obeh skupinah krvodajalcev je bil v letih od 2016 do 2019 presežen. Pogostih vzrokov za odklon je bilo 40,9% , ostalo so drugi vzroki.

V letom 2020 je prišlo do spremembe, saj smo uvedli naročanje krvodajalcev na odvzem krvi. V letih od 2020 do 2023 smo uspeli realizirati cilj pri odklonih krvodajalcev. Deleži vzrokov odklonov so bili v tem obdobju podobni prejšnjim, s 45,7% zaradi pogostih vzrokov in do 44,3% zaradi drugih vzrokov.

Delež vseh odklonjenih krvodajalcev se je zmanjšal v zadnjem obdobju, v primerjavi z obdobjem med 2016 in 2019. Vendar je ta delež primerljiv s prvim obdobjem.

Zaključek. Predlagamo stalno obveščanje javnosti o pomenu krvodajalstva v Sloveniji in o kriterijih za izbor krvodajalcev za darovanje krvi, ter s tem lahko zmanjšamo število odklonjenih krvodajalcev zaradi drugih opredeljenih vzrokov.

Delati moramo na vsestranski promociji krvodajalstva med mladimi in delovno aktivnimi državljani. Širiti moramo bazo novih krvodajalcev. Izdelati bo potrebno strategijo krvodajalstva v Sloveniji.

Avtomatiziran način dela v imunoematološkem laboratoriju

Tjaša Kovše, Karin Fridau, Bojana Živković

Center za transfuzijsko medicino Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

bojana.zivkovic@ukc.mb.si

V centru za transfuzijsko medicino (CTM) imunoematološke preiskave izvajamo v štirih imunoematoloških laboratorijih (IHL). Poleg določevanja krvne skupine pacientom in nosečnicam opravljamo tudi druge preiskave kot so: določanje eritrocitnih antigenov, direktni in indirektni Coombsov test, specifikacija protiteles, navzkrižni preizkus... V centru za transfuzijsko medicino (CTM) letno opravimo okoli 200000 imunoematoloških preiskav. Za zagotavljanje varnega dela smo leta 2021 uvedli avtomatiziran način določevanja krvnih skupin in v letu 2023 tudi samega predtransfuzijskega testiranja.

Za zagotavljanje večje varnosti in sledljivost pri izvajanju preiskav v imunoematoloških laboratorijih smo ročni način dela zamenjali z avtomatiziranim načinom. V ta namen smo v CTM MB pridobili 4 aparate IH-500 podjetja BIO-RAD. Aparat nam omogoča avtomatizacijo celotnega postopka pipetiranja vzorcev, dodajanja reagentov, inkubacije, centrifugiranja in zajemanja slike.

Pred nalaganjem v sistem ni potrebno predhodno razvrščanje vzorcev. Reagente lahko neprekinjeno hranimo v aparatu 7 dni. Možen je notranji popis do 92 gel kartic, 34 vial z reagenti in 4 stojal za redčila. IH-500 lahko naloži do 50 vzorcev. Ko so v sistem naloženi dodatni rutinski vzorci, aparat samodejno razporeja obdelavo za optimalno pretočnost. Ko so prednostni vzorci vključeni v delovni tok, bo aparat prekinil manj pomembne procese, da bo rezultat zagotovil na najučinkovitejši možni način. Vsi parametri, ki sodelujejo pri testiranju vzorcev, se nenehno spremljajo in beležijo.

Pred pričetkom uporabe aparata IH-500 za redno delo se je izvedla validacija. Validacija je trajala

približno mesec dni. V tem času smo vzporedno testirali vzorce ročno in na analizator. Namen je bilo preveriti natančnost, zanesljivost in ponovljivost rezultatov testiranja v primerjavi z uporabo dosedanjih analizatorjev ter pravilen prenos naročila iz informacijskega sistema (IS) Datec v analizator in prenos rezultatov iz analizatorja v IS Datec.

Potrdili smo pravilno delovanje analizatorja v skladu z zagotovili proizvajalca in našimi zahtevami pri pogojih dela.

Z rednim delom v IHL I, kjer določamo krvne skupine pacientom in nosečnicam in izvajamo dodatne imunohematološke preiskave, smo na aparat IH-500 začeli delati junija leta 2021, po validaciji, ki je trajala od 13.5.2021 do 03.06.2021. Podatki o vrsti in številu preiskav izvedenih med validacijo so prikazani v tabeli 1.

Tabela 1: Vrsta in število preiskav izvedenih med validacijo v IHL I

Vrsta preiskav	Letno število testov (2021)	Število testov pri validaciji
Krva skupina AB0/RhD	12100	51
Določitev Kell antigena	6900	53
ICT	11700	34
DCT	700	24

V letu 2023 pa smo izvedli tudi validacijo aparata v laboratoriju za predtransfuzijsko testiranje (IHL II), ki je trajala od 22.3.2023 do 27.3.2023. Podatki o vrsti in številu preiskav izvedenih med validacijo so prikazani v tabeli 2.

Rezultati obeh validacij so potrdili, da analizator IH-500 v obeh laboratorijih (IHL I in IHL II) daje zanesljive rezultate, ki so primerljivi z rezultati ročnega dela, zato smo ga lahko začeli uporabljati v rutini.

Tabela 2: Vrsta in številopreiskav izvedenih med validacijo v IHL II

Vrsta preiskave	Letno število testov (2023)	Število testov pri validaciji
Krvna skupina AB0/RhD	8156	18
Antigen Kell	3791	6
Krvna skupina ABD VI-	27733	49
Rh fenotip	356	7
ICT	9921	32
DCT	417	4
Navzkrižni preiskus	21499	79

Zaključek

Z avtomatizacijo smo zmanjšali možnost človeške napake, ročne manipulacije vzorcev in subjektivnost pri odčitavanju rezultatov. Avtomatizacija nam omogoča sledljivost opravljenih preiskav, reagentov in izvajalcev, prav tako pa se je optimiziralo samo delo v laboratoriju. V CTM v času avtomatizacije nismo zaznali napak ali odklonov v delovanju analizatorja. Vseh preiskav v imunohematoloških laboratorijih ni mogoče avtomatizirati. V Centru za transfuzijsko medicino UKC MB si želimo, da bi v prihodnjih letih dobili nastavke za pediatrične vzorce, saj le te sedaj

testiramo na ročni način. Prav tako si prizadevamo, da bi na aparat začeli izvajati tudi teste specifikacij protiteles v različnih medijih.

Literatura

1. BIO-RAD: IH-500, Navodila za uporabo, 2018: 13-29

Rezultati presejalnega testiranja krvodajalcev na označevalce okužb v 25 letnem obdobju v severovzhodni Sloveniji

Božislava Majcen Vivod, Bojana Bizjak

Center za transfuzijsko medicino UKC Maribor

bozislava.majcenvivod@ukc-mb.si

UVOD

Od prvega opisa prenosa sifilisa z direktno transfuzijo krvi leta 1915 se zavedamo, da transfuzija krvi nosi s seboj tudi možnost prenosa povzročiteljev bolezni, zato je testiranje vsake odvzete enote krvi in krvne komponente eden najpomembnejših dejavnikov zagotavljanje varne krvi.

V Sloveniji od leta 1960 izvajamo presejalno testiranje za sifilis, od leta 1970 za površinski antigen virusa hepatitisa B (HBsAg), od leta 1986 za protitelesa proti virusu HIV (anti-HIV) in od leta 1993 za virus hepatitisa C (anti-HCV). Odkrivanje virusnih nukleinskih kislin NAT (Nucleic Acid Amplification Technology - metoda pomnoževanja nukleinskih kislin), s katero uspemo zaznati okužbo v obdobju diagnostičnega okna pred pojavom seroloških označevalcev okužb, izvajamo v Sloveniji od leta 2000, najprej za HCV in nato od leta 2007 tudi za preostala dva virusa – Hepatitis B in HIV.

Vse presejalne teste razen NAT smo z namenom povečanja varnosti krvi implementirali tudi v transfuzijski službi v Mariboru.

Po pravilniku o obveznem testiranju krvi in komponent krvi (uradni list RS, št.9/07) se testiranje izvaja po nacionalnih algoritmih, ki jih določi Razširjeni strokovni kolegij za transfuzijsko medicino.

Presejalna testiranja vzorcev krvi krvodajalcev opravljamo v Centru za transfuzijsko medicino UKC Maribor v virološkem laboratoriju. Po reorganizaciji transfuzijske dejavnosti v Sloveniji leta 2003 je Center za transfuzijsko medicino Maribor postal odgovoren za oskrbo s krvjo in presejalno

testiranje krvi v severovzhodni Sloveniji. NAT testiranja in potrditvena testiranja se opravljajo na Zavodu RS za transfuzijo v Ljubljani.

NAMEN: Analizirali smo podatke o pozitivnih rezultatih presejalnega testiranja krvi krvodajalcev v 25- letnem obdobju od leta 1999 do 2023.

METODE: Večina vzorcev krvodajalcev je bila testirana na avtomatskem analizatorju BEP 2000 Advance (Siemens) z uporabo encimsko imunskih testov (EIA). Hepatitis B je bil testiran z reagentom HBsAg (Siemens), HIV z reagentom Enzygnost HIV Integral (Siemens) in sifilis z EIA sifilis reagentom (Siemens), hepatitis C z Ortho HCV regentom (Ortho-Clinical Diagnostics). Druga metoda testiranja se je izvajala na sistemu Abbott AxSYM in od leta 2008 Abbott Architect. Testiranje z reagenti Siemens je leta 2016 bilo zaradi zastarelosti sistema in težav pri testiranju ukinjeno. Tako so vsi vzorci bili testirani samo z reagenti Abbott Architect ali po potrebi na Zavodu RS za transfuzijo. Septembra leta 2019 je testiranje na Abbot Architectu ukinjeno. Testi se od takrat izvajajo na Abbott Alinity i , ki je zamenjal aparat Architect.

REZULTATI: V 25 letnem obdobju je bilo testiranih 572.481 vzorcev krvi. Med testiranimi vzorci je bilo 69 (0,01 %) krvodajalcev pozitivnih na hepatitis B med njimi 56 (0,01%) HBsAg pozitivnih in 13 (0,002%) le NAT HBV pozitivnih, 38 (0,006%) HBsAg pozitivnih krvodajalcev je bilo odkritih ob prvem darovanju krvi. HIV pozitivnih krvodajalcev je bilo 9 (0,001%), 3 (0,0006%) odkriti ob prvem darovanju krvi. Okužbo s hepatitis C virusom smo potrdili pri 34 (0,006%) krvodajalcih, 21 (0,004%) jih je bilo odkritih ob prvem odvzemu, eden (0,0002%) je bil odkrit le z metodo NAT po uvedbi posamičnega testiranja in je bil pozitiven le HCV RNA. Okužbo s sifilisom smo potrdili pri 68 (0,01%) krvodajalcih, 13 (0,003%) je bilo odkritih ob prvem darovanju krvi (Tabela 1).

Tabela 1:

LETO	HBsAg	HIV	HCV	SIFILIS	Št.testiranih vzorcev
1999	7	0	2	5	13071
2000	5	0	1	6	12718
2001	4	0	4	5	11742
2002	3	0	3	1	12531
2003	3	0	1	0	20743
2004	5	0	0	2	21840
2005	2	2	2	1	30423
2006	7	0	1	2	30350
2007	2+2 NAT	0	4	4	29728
2008	3+1NAT	0	3+1 NAT	5	30895
2009	4	0	2	6	31061
2010	1	2	0	4	31409
2011	0+2 NAT	1	0	5	32440
2012	1	0	2	4	30634
2013	2+1 NAT	2	0	3	29351
2014	3	1	1	1	21169
2015	2+1NAT	0	1	4	29449
2016	0	1	2	2	20656
2017	0	0	1 (NAT neg)	0	19834
2018	0+1 NAT	0	0	1	19089
2019	1+1NAT	0	0	0	18937
2020	0+2NAT	0	1	3	17580
2021	0+1NAT	0	0	1	19226
2022	1+1NAT	0	2	2	18679
2023	0	0	0	1	18926
Število pozitivnih dajalcev	69 (56 EIA +13 NAT HBV)	9	34 (33 EIA+1 NAT v diagn.oknu)	68	572.481

ZAKLJUČEK: Rezultati kažejo na veliko nihanje med številom pozitivnih krvodajalcev na hepatitis B in C v 25 letnem obdobju, nizko število okužb z virusom HIV in občasno rast števila okužb s sifilisom, še posebno med rednimi krvodajalci.

Vsi HBV NAT pozitivni krvodajalci so bili odkriti med rednimi krvodajalci in so HBsAg negativni. Pri vseh je pozitiven test na anti-HBc, ki se v Sloveniji rutinsko žal ne opravlja, ker ni predpisan. Med 34 pozitivnimi krvodajalci na hepatitis C je bil le 1 pozitiven samo z metodo NAT v diagnostičnem oknu, medtem ko je rezultat presejalnega testa EIA anti-HCV postal pozitiven šele več kot mesec dni kasneje.

Iz podatkov o hepatitisu B lahko ugotovimo, da je okužba s hepatitisom B s krvjo še vedno možna, kljub temu da je testiranje na HBsAg bilo uvedeno že leta 1970. Žal določanje HBsAg, brez testiranja protiteles anti-HBc ne odkrije skrite okužbe, oziroma oseb z okultnim hepatitisom B. Te osebe, ki imajo skrito okužbo za katere ne vedo, so tako možni vir posttransfuzijske okužbe tudi v 21. stoletju. Možnost prenosa se je po uvedbi NAT testiranja leta 2007 zmanjšala, podobno bi dosegli tudi z uvedbo preprostejšega določanja anti-HBc protiteles.

Ob pojavu vedno novih virusnih bolezni kot so zika, chikungunya, virus zahodnega Nila, pa parazitarnih kot je denga, prionskih bolezni ter tudi bakterijskih okužb, ki se pojavljajo po različnih koncih sveta in se prenašajo s krvjo, je skrb za varno kri izjemno pomembno področje transfuzijske dejavnosti. Varno transfuzijo nam poleg testiranj, omogoči lahko izbira zdravih krvodajalcev, ki ne živijo tvegano in budno spremljanje pojavljanja bolezni po različnih delih sveta.

Literatura:

1. Brecher ME. Bacterial and parasitic contamination of blood components. Bethesda, American Assotiation of Blood Banks, 2003;1-125.
2. Mac Callum FO, Bradley WH. Transmission of infective hepatitis to human volunteers. Lancet 1944;2-228.
3. Kann M, Gerlich WH. Hepatitis B. In: Topley and Wilson s Microbiology and moicrobial infectins. 9th ed. Volume 1, Virology. Avon: Bath Press; 1998. p.745-73.
4. Van der Poel. Screening for hepatitis viruses. In:Barbara JAJ, Sultsman MK, Rossi U. Proceedings of ESTM residential course. Parnu; 1998. p. 27-31.
5. Crusius T. Blood donor screening for anti-HBc to prevent transfusion-transmitted infection. In: Barbara JAJ, Sultsman MK, Rossi U. Proceedings of ESTM residential course. Parnu; 1998. p.55-61.
6. Pravilnik o obveznem testiranju krvi in komponent krvi. Uradni list RS, št. 9/2007; 1. 2007. p. 932.
7. Levičnik Stezinar. Prenos okužbe HBV s transfuzijo SZP - prikaz primera. In: 5.Slovenski kongres transfuzijske medicine z mednarodno udeležbo, 2015 Laško, Slovenija. V Ljubljani; 2016. p. 216-217.
8. Majcen Vivod B. Prevalence of infection disease markers In: Transfusion; A Supplement to Transfusion. Abstract Presentations from AABB Annual Meeting and CTTXPO, Boston; 2012. p. 216-17.

Alling blood donors in transfusion center General hospital Celje between 2019-2023

Tanja Mlakar Koprivc, Mirjam Orožim, Vojka Krobat

Transfusion Centre, Celje General Hospital, Slovenia

tanja.mlakar-koprivc@sb-celje.si

Introduction

To ensure a sufficient amount of blood for health care purposes, it is necessary to ensure a sufficient number of blood donors. Blood donation and self-sufficiency in blood supply are important indicators of selflessness, human ties and nobility of a nation. At the Celje Transfusion Centre, we call blood donors based on blood supplies and the need for certain blood types.

Methods

The retrospective analysis of the proportion of blood donors, who responded to our call for the period from 2019 to 2023. During the time 6.052 blood donors we called (an average of 1.513 blood donors per year).

Results

In 2019, in Transfusion Centre, a quality indicator was defined. Our goal was to get to respond 50 % invited. After the public life in Slovenia stopped during the new coronavirus epidemic, the functioning of the healthcare system changed. In order to prevent the spread of infections and introduce protective measures, the Transfusion Centre also had to adapt the organisation and procedures of work, both ordering and blood collection. Donors reported blood donations by telephone or, mostly through targeted calling of known and suitable blood donors, based on supplies and needs. Already by phone, blood donors were interviewed, if they met the conditions for blood donation and ordered them to the desired appointment.

Calling blood donors and ordering by phone has been well received by blood donors. Between 2019 and 2023, 6.052 blood donors were called; 4.670 blood donors responded to our call.

After the measuring of quality indicator was started, the most called blood donors were recorded in 2021, the least in 2019. The

proportion of blood donors who responded to our call was 77.1 %. Our goal has been achieved.

Conclusion

Despite the rapid development of science and, with that, transfusion medicine as well, donor blood remains an irreplaceable drug. Blood is the fluid of life, and blood donation is the most humane action. The best we can do for our fellow human beings is to donate blood. The upbringing of a blood donor begins already with the upbringing of the youth. The secondary school population, especially adult students, represent a great potential for new, young blood donors.

Transfusion activity has the task of ensuring high-quality and safe treatment with blood, blood products and drugs from the blood. In cooperation with representatives of the Red Cross, we encourage the inhabitants to donate blood and maintain an active relationship with them. When selecting donors and at work, we take into account Slovenian legislation, the Council of Europe Recommendation and European Community directives on the preparation, use and quality assurance of blood components.

Spremembe krvne skupine ob hudem zagonu AIHA pri bolniku po alogenski PKMC-predstavitev primera z vidika transfuziologa

Brina Šebez¹, Mojca Zupan¹, Matjaž Sever², Sanja Sobočan Koša¹

¹Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

²Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana

brina.sebez@ztm.si

UVOD

Razvoj avtoimunskih bolezni je vse bolj prepoznan zaplet po presaditvi krvotvornih matičnih celic (PKMC). Med avtoimunskimi stanji, ki se razvijejo po PKMC, poročajo o avtoimunskih citopenijah, med katerimi je najpogostejša avtoimunska hemolitična anemija (AIHA). AIHA je redek zaplet, ki ga je težko diagnosticirati, običajno je odporna na standardno zdravljenje ter se pogosto ponovi. Patofiziologija avtoimunih bolezni je na splošno zapletena, še bolj zapletena pa je imunska disregulacija po PKMC. Dejavniki tveganja za razvoj AIHA po PKMC vključujejo nemaligno bolezen kot indikacijo za PKMC, presaditev nesorodnega ali haploidentičnega darovalca, periferno ali popkovnično kri kot izvor matičnih celic, prisotnost bolezni presadka proti gostitelju (angl. *graft-versus-host disease* oz. GVHD) in okužbe. Ti dejavniki tveganja lahko prispevajo k izgubi samotolerance in nepopolni imunski obnovi po PKMC, kar vodi do nekontroliranega deljenja avtoaktivnih limfocitov v imunokompromitiranem gostitelju.

PRIKAZ PRIMERA

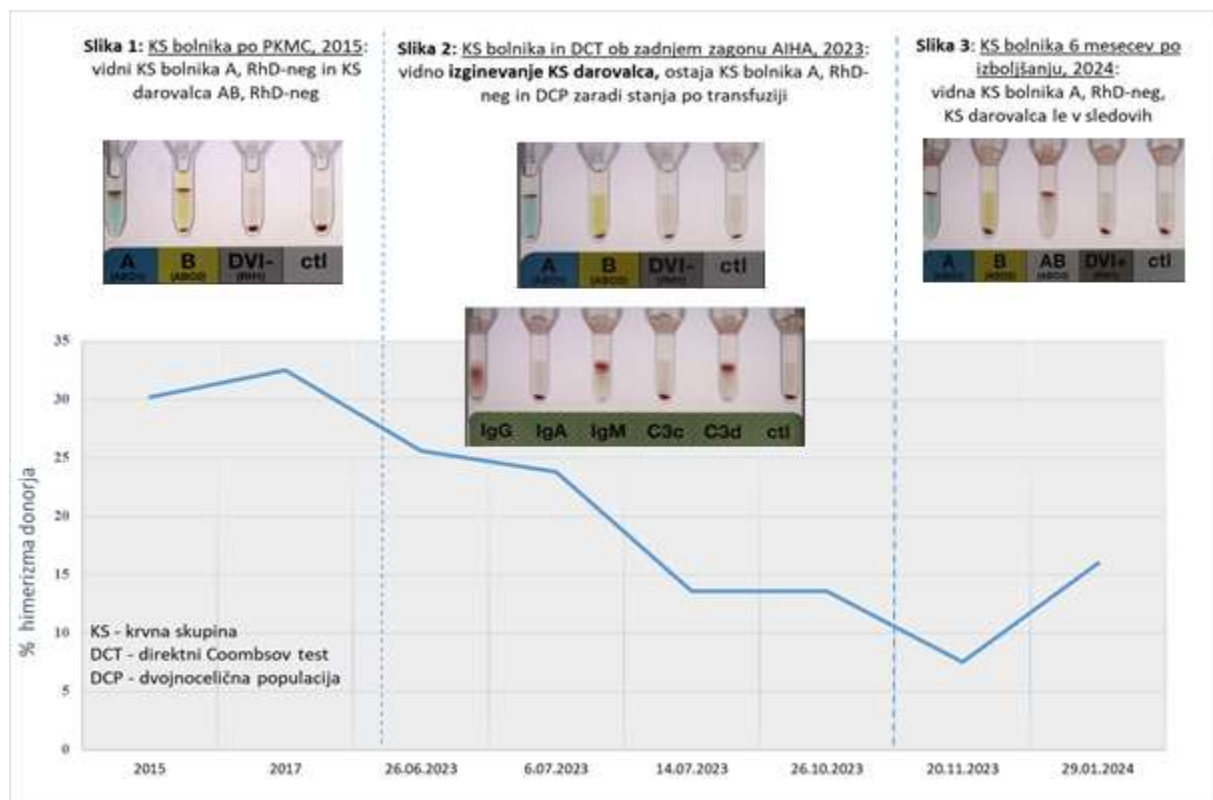
Pri 25-letnem bolniku z B-celično akutno limfoblastno levkemijo (B-ALL) po alogenski haploidentični PKMC je prišlo do prvega zagona AIHA leta 2015. Poleg imunosupresivne terapije je potreboval transfuzijsko zdravljenje. Imunohematološka diagnostika je bila opravljena na Centru za imunohematologijo Zavoda RS za transfuzijsko medicino. V direktnem delu krvne skupine (KS) ABO smo potrdili prisotnost linije prejemnika, ki je bila v osnovi A, RhD-neg in linije

darovalca, ki je AB, RhD-neg (**slika 1**). Po nemieloablativni kemoterapiji je bil namreč izhodiščni himerizem darovalca le 30 % in s tem ohranjena eritropoeza tako darovalca kot prejemnika. Himerizem je vztrajal praktično nespremenjen kljub vnovičnim zagonom AIHA vse do zadnjega. Reverzni del KS je bil skladen z darovalčevo. Poleg kliničnih in laboratorijskih pokazateljev hemolize smo dokazali imunsko komponento močno reaktivnih eritrocitnih avtoprotiteles. Od takrat dalje smo za bolnika pripravljali enote skladne s KS ABO prejemnika po presaditvi in zaradi prisotnih panreaktivnih avtoprotiteles skladne v preostalih klinično pomembnih eritrocitnih antigenih.

Zadnji zagon AIHA je konec leta 2022 sprožila okužba s *Clostridium Difficile*. Tokrat smo prvič beležili primer spremembe KS pri bolniku po alogenski PKMC ob hudem zagonu AIHA (**slika 2**). Direktni in indirektni Coombsov test ter nadaljnja serološka diagnostika z elucijo protiteles in avtoadsorbicijo je ponovno potrdila prisotnost močno reaktivnih avtoprotiteles. Imunohematološka diagnostika je bila opravljena z metodo aglutinacije na gelskih karticah po standardnih operativnih postopkih.

Hkrati nas je zanimalo kaj se dogaja s hematopoezo na molekularnem nivoju, zato smo opravili več meritev himerizma darovalca, ki je padel z izhodiščnih 30 % najnižje na 7 % (**graf 1**).

Graf 1: Himerizem darovalca in imunohematološke najdbe skozi čas pri bolniku po PKMC ob zagonu AIHA



Po odstranitvi vzroka za zagon AIHA in ob močni imunosupresiji se je klinično stanje bolnika izboljšalo. Prišlo je do upada parametrov hemolize in stabilizacije hematopoeze. Vztrajno povišan ostaja le LDH, kar sovпада z imunohematološko najdbo v smislu vztrajajočih avtoprotiteles. Več kot 6 mesecev po kliničnem izboljšanju se je delež himerizma darovalca nekoliko izboljšal, vendar še zmeraj ne dovolj, da bi lahko s standardno metodo zaznali eritropoezo linije darovalca. Tako ostaja KS ABO prejemnika kot pred presaditvijo (**slika 3**).

RAZPRAVA IN ZAKLJUČEK

Bolnika z B-ALL po alogenski haploidentični PKMC smo na Zavodu RS za transfuzijsko medicino obravnavali zaradi hudega zagona AIHA po okužbi s *Clostridium difficile*. Iz transfuziološkega vidika smo opazili zanimiv in redek primer izginjanja KS darovalca ob določitvi s standardno metodo. Prav tako smo prvič beležili signifikantni upad himerizma darovalca ob zagonu AIHA. Z direktnim in indirektnim Coombsovim testom ter elucijo protiteles in avtoadsorbicijo smo dokazali imunsko komponento močno reaktivnih eritrocitnih avtoprotiteles, ki vztrajajo kljub kliničnemu izboljšanju.

AIHA sodi med avtoimunske citopenije, ki so redek zaplet v sklopu neklasičnega kroničnega GVHD po PKMC. V literaturi je incidenca avtoimunskih citopenij po PKMC ocenjena na 2 do 8 %. Patofiziologija je slabo razumljena. Raziskave kažejo, da avtoimunske citopenije nastanejo zaradi izrazite imunske disregulacije po alogenski PKMC, pri čemer je poudarjeno pomanjkanje centralne in periferne imunske tolerance zaradi nezmožnosti regulatornih celic T, da bi omejile avto- ali aloreaktivne celice B. Od dejavnikov tveganja za razvoj AIHA po PKMC, ki so opisane v literaturi, je imel naš bolnik haploidentičnega darovalca ter okužbo.

6 mesecev po ozdravitvi, ko so bili klinično in laboratorijsko že odsotni znaki hemolize, himerizem pa se je nekoliko izboljšal, bi pričakovali tudi vzpostavitev eritropoeze darovalca, a tega do sedaj še ne beležimo. KS se ni povrnila na izhodiščno raven, vztrajajo serološko dokazljiva močno reaktivna avtoprotitelesa.

Z občutljivejšimi metodami ter razširjeno diagnostiko bomo v prihodnosti morda bolje razumeli patofiziologijo avtoimunskih citopenij. Pri takšnih redkih in nenavadnih primerih je ključno sodelovanje hematologov in transfuziologov, ki ob spremljanju klinične slike ter hkratni analizi imunohematoloških rezultatov pridobijo boljši vpogled v značilnosti in agresivnost bolezni, kar vodi do uspešnejšega zdravljenja pacientov.

LITERATURA

1. Cuvelier GDE, Schoettler M, Buxbaum NP, Pinal-Fernandez I, Schmalzing M, Distler JHW, et al. Toward a Better Understanding of the Atypical Features of Chronic Graft-Versus-Host Disease: A Report from the 2020 National Institutes of Health Consensus Project Task Force. *Transplant Cell Ther.* 2022 Aug;28(8):426-445.
2. Neunert CE, Despotovic JM. Autoimmune hemolytic anemia and immune thrombocytopenia following hematopoietic stem cell transplant: a critical review of the literature. *Pediatr Blood Cancer.* 2019;66:e27569.
3. Wang M, Wang W, Abeywardane A, Adikarama M, McLornan D, Raj K, de Lavallade H, Devereux S, et al. Autoimmune hemolytic anemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: analysis of 533 adult patients who underwent transplantation at King's College Hospital. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Jan;21(1):60-6.

Validacija postopka priprave in kontrola kakovosti patogeno inaktiviranih trombocitov z metodo Intercept (Cerus)

Aleksandra Šumak, Jasna Kolarič, Bojana Bizjak

Center za transfuzijsko medicino UKC Maribor

UVOD

V CTM Maribor smo v letu 2022 uvedli metodo inaktivacije patogenov v trombocitnih pripravkih z metodo Intercept (Cerus) z amotosalenom (psoralenom) in UVA žarki. Validacija je potekala od junija do septembra 2022, v decembru 2022 pa smo pričeli z rutinskim delom.

NAMEN DELA

Namen validacije je preveriti ali so enote inaktiviranih trombocitov (TBP), ki jih pripravljamo s setom Intercept large volume (LV), skladne s standardi kakovosti. Predstavljamo rezultate validacije postopka inaktivacije trombocitov in rezultate kontrole kakovosti v letu po začetku izvajanja metode v rutini.

MATERIALI IN METODE

Koncentrirane trombocite z odstranjenimi levkociti in dodano ohranitveno raztopino (TFB) rutinsko pripravljamo z zlitjem 5 enot BC in 280ml ohranitvene raztopine Intersol naslednji dan po odvzemu krvi (D1). Pred inaktivacijo morajo TFB ustrezati zahtevam za metodo Intercept: število trombocitov v zlitjih $\geq 2,5-7,0 \times 10^{11}$ /enoto, volumen 300-420ml, število levkocitov $< 1,0 \times 10^6$ /enoto, število eritrocitov $< 4 \times 10^6$ /ml, zahtevan delež plazme v zlitjih 32-47%.

Inaktivacijo izvajamo takoj po pripravi TFB. Enoto TFB z dodanim amotosalen hipokloridom obsevamo, po obsevanju pripravek prelijemo v CAD (compound absorption device), vrečko z adsorpcijsko blazinico, ki adsorbira preostali amotosalen in presnovne produkte. CAD vrečko hranimo na tresalniku najmanj 6 in največ 16 ur, preden se pripravek prelije v končno vrečko za

hranjenje trombocitov. Inaktivirani trombocitni koncentraci so uporabni do 7 dneva po odvzemu (D7).

Po izvedenem postopku inaktivacije morajo enote TBP ustrezati naslednjim zahtevam: število trombocitov $\geq 2,0 \times 10^{11}$ /enoto, pH ob koncu uporabnosti $> 6,4$. Pri izvedbi postopka smo spremljali izgubo volumna ter število trombocitov in pH od D2 do D7.

REZULTATI

V sklopu validacije smo vzorčili in testirali 15 enot trombocitov, rezultati vseh parametrov pred in po aktivaciji so bili ustrezni. Povprečno število trombocitov v enotah TFB pred inaktivacijo je bilo $3,69 \times 10^{11}$ /enoto (sd=0,44), volumen 358ml (sd=8), rezidualni eritrociti $0,3 \times 10^6$ /ml (sd=0,1), delež plazme v zlitjih 35% (sd=1).

Po izvedenem postopku inaktivacije je povprečno število trombocitov v TBP $3,30 \times 10^{11}$ /enoto (sd=0,39). Število trombocitov je do D7 padlo na $3,03 \times 10^{11}$ /enoto (sd=0,38). Izguba volumna pri postopku je povprečno 25ml (sd=5ml). Na dan zapadlosti je povprečen pH enot TBP 6,93 (sd=0,04).

Rezultati kontrole kakovosti v letu 2023 so ustrezni pri vseh parametrih za TFB in TBP in ne odstopajo od rezultatov pridobljenih pri validaciji.

ZAKLJUČEK

Metodo inaktivacije patogenov Intercept (Cerus) smo po validaciji postopka uspešno vpeljali v rutino. Rezultati validacije in kontrole kakovosti v vseh parametrih ustrezajo zahtevam v monografiji Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, Council of Europe, 20 izdaja.

Beleženje napak v transfuzijskem centru Splošne bolnišnice Celje med letom 2014 in 2023

Mirjana Kunaj, Urška Turnšek, Jožica Ojsteršek

Transfuzijski center Celje, SB Celje

urska.turnsek@sb-celje.si

Uvod

Beleženje in analiza napak v predanalitski, analitski in poanalitski fazi pripomore k odkrivanju kritičnih točk v laboratorijskem delovnem procesu. Pomembno je, da napake prepoznamo, razvrstimo, zabeležimo, raziščemo vzroke za nastanek in pogostnost pojavljanja ter jih odpravimo. V Transfuzijskem centru Splošne bolnišnice Celje (TC) odkrite napake razvrstimo, zabeležimo in analiziramo. Z analizo zabeleženih napak odkrijemo kritične točke, opredelimo tveganja v delovnih procesih in uvedemo ukrepe, ki preprečujejo in/ali zmanjšajo število napak.

Metode

Naredili smo retrospektivno analizo pogostejših napak za obdobje od januarja 2014 do decembra 2023. V tem času smo testirali 133017 vzorcev (v povprečju 13301 letno) in opravili 899646 testov (v povprečju 89965 letno).

Rezultati

V TC napake delimo na napake naročnikov in napake nastale v TC. Za lažje spremljanje napak smo pripravili nabor napak.

Od januarja 2014 do decembra 2023 smo zabeležili 2415 napak. V tem obdobju smo zabeležili 1320 napak naročnikov in 1095 napak narejenih v TC. Najpogostejše napake naročnikov so bile: neskladnost osebnih podatkov bolnika na naročilnici in epruveti (277), pomanjkljiva naročilnica (486), napačna orientacijska določitev krvne skupine AB0+RhD (176) in napačna kri v epruveti – WBIT (21). V TC so bile najpogostejše napake: administrativna napaka pri vnosu osebnih podatkov

bolnika (329), vpisan napačen naročnik (114), izvid poslan napačnemu naročniku (49), izdan napačen izvid z napačnim rezultatom – ni bil poslan naročniku (43) in v postopku testiranja ni bil dodan bromelin (116). V tem obdobju smo zaznali tudi napake, ki so se pojavile samo nekajkrat: naročilo za napačnega bolnika, kri transfundirana napačnemu bolniku, kri izdana za napačnega bolnika vendar ne transfundirana.

Zaključek

S prepoznavo in analizo napak pripomoremo k izboljšanju kakovosti naših storitev.

Z razvojem transfuzijske stroke in uvajanjem novosti se spreminja vrsta in število prepoznanih napak. V TC se tega zavedamo, zato prilagajamo in izboljšujemo način prepoznave in beleženja le-teh. S stalnim izobraževanjem naročnikov in zaposlenih krepimo ozaveščanje o pomenu beleženja napak in pripomoremo k zmanjšanju števila le-teh. Možnosti za zmanjšanje števila napak v prihodnosti vidimo v uvedbi elektronske naročilnice, sistematičnih črtnih kod s podatki bolnika, avtomatizaciji predtransfuzijskega testiranja in v posodobitvi transfuzijskega informacijskega sistema. Z aktivnim pristopom k prepoznavi, beleženju in zmanjšanju števila napak bomo nadaljevali tudi v prihodnje.

