

Združenje hematologov Slovenije (ZHS)



Združenje za transfuzijsko medicino Slovenije (ZTMS)



Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v hematologiji (SMSZT)

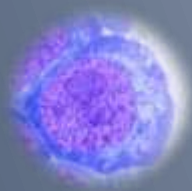


Hematološko laboratorijsko združenje (HLZ)



Zbornik povzetkov april 2025

Podčetrtek 11. – 12. April 2025



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 2025

Podčetrtek, 11.-12. april 2025

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 2025

Strokovni recenzenti: Matevž Škerget, Boštjan Jovan, Alenka Dobrovoljc, Marko Cukjati, Tadej Furlan, Katarina Reberšek, Helena Podgornik, Martina Fink, Marko Cukjati, Primož Poženel, Polonca Mali, Irena Bricl, 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 2025

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani
COBISS.SI-ID 231731203
ISBN 978-961-95890-7-6 (PDF)

Vsebina

Preprečevanje prenosa CMV s transfuzijo krvnih komponent (ZTMS)	1
Citomegalovirus, diagnostika in klinični pomen	1
Okužbe s citomegalovirusom v nosečnosti in pri novorojenčku	7
Zagotavljanje CMV seronegativnih krvnih komponent na Zavodu RS za transfuzijsko medicino	13
Varna preskrba s krvjo in CMV	18
Diagnostični izzivi pri limfoproliferativnih boleznih (ZHS, HLZ)	23
Klinika in diagnostični pristop k limfocitnim novotvorbam	23
Celični označevalci pri prekursorskih limfocitnih novotvorbah	29
Celični označevalci pri novotvorbah zrelih B celic	33
Pomen genetskih preiskav v diagnostiki limfocitnih novotvorb	36
Izzivi pri mobilizaciji in zbiranju krvotvornih matičnih celic (ZHS, HLZ, ZTMS)	41
Učinkovitost preliksatorja pri mobilizaciji krvotvornih matičnih celic	41
Izzivi afereznih postopkov zbiranja krvotvornih matičnih celic pri visokem številu levkocitov	46
Eritrocitoza pri krvodajalcih	51
Ukrepanje pri neodzivnosti na trombocitno plazmo	55
Kronična mieloična levkemija (ZHS)	61
Rezultati slovenskega registra KML in predlog smerni	61
Akutna mieloična levkemija (ZHS)	62
Podatki kliničnih raziskav o pomenu spremljanja FLT3-ITD- MRD	62
Potek in omejitve določanja MRD pri FLT3-ITD	66
Pomen sledenja NPM1 MRD in naše izkušnje	70
Pomen vzdrževalnega zdravljenja z oralnim azacitidinom, vloga indukcije in pridruženih genetskih nepravilnost	75
Mesto CPX 351 pri zdravljenju AML- naše izkušnje	78
Limfoproliferativne bolezni (ZHS)	83
Zdravljenje dlakastocelične levkemije- mesto konsolidacije in BRAF zaviralcev	83
Diagnostika in zdravljenje levkemije velikih granuliranih limfocitov	87

Centralna prizadetost ob kronični limfocitni levkemiji	92
Bing-Neel sindrom	96
Okužbe pri krvnih boleznih (ZHS)	100
Bronhoskopija in BAL pri bolnikih s krvnimi boleznimi	100
Učinkovitost transfuzije granulocitov pri hematoloških bolnikih	106
Paliativna obravnava hematoloških bolnikov (SMSZT)	111
Paliativna obravnava bolnikov v hematologiji	111
Paliativna oskrba otrok in mladostnikov na kliničnem oddelku za otroško hematologijo in onkologijo	115
Organizacija paliativne oskrbe v Splošni bolnišnici Slovenj Gradec	118
Oskrba paliativnih bolnikov na domu	124
Psihološka podpora svojcev bolnikov v paliativni oskrbi	127
Psihološka podpora žalujočim po izgubi svojca	132
Hemato-onkološki bolnik in prehranska dopolnila – varnost oz. nevarnost?	137
Ali posvečamo dovolj pozornosti simptomom anemije?	141
Aplikacija železovih pripravkov	147
Ukrepanje ob sopojevih med zdravljenjem z bispecifičnimi protitelesi	151
Trombocitopenija in anemija (HLZ)	156
Primarna imunska trombocitopenija (ITP)	156
Trombocitna protitelesa - klasične imunohematološke preiskave	159
Paroksizmalna nočna hemoglobinurija (PNH)	163
Imunohematologija (ZTMS)	167
Vpliv topnih substanc na določitev krvne skupine ABO	167
Pregled obstoječih sistemov krvnih skupin	172
Neujemanje orientacijske določitve krvne skupine na ploščici z določitvijo na gelu zaradi Tn antigena	178
Šibka podskupina A pri krvodajalcu s hladnimi protitelesi – prikaz primera	181
Prikaz delovanja nacionalnega registra prostovoljnih nesorodnih darovalcev KMC Slovenija Donor	186
Hemovigilanca	190

Transfuzija komponente neustrezne kakovosti - krvni strdek v enoti eritrocitov- Predstavitev primera in navodila za postopanje.....	190
Mikrobiološka kontrola trombocitnih pripravkov za transfuzijo – pomen, izvajanje in ukrepanje ob pozitivnih rezultatih	195
Transfuzijska obravnava TRALI.....	201
Poročilo Službe za hemovigilanco za leto 2024	209
Preprečevanje prenosa okužb s transfuzijo krvi	214
Porajajoče se okužbe in njihov pomen v transfuzijski medicini.....	214
Virus Zahodnega Nila in preskrba s krvjo.....	218
Hepatitis E – stanje v EU	222

Preprečevanje prenosa CMV s transfuzijo krvnih komponent (ZTMS)

Citomegalovirus, diagnostika in klinični pomen

Tina Uršič, Miroslav Petrovec

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani.

tina.ursic@mf.uni-lj.si

Povzetek

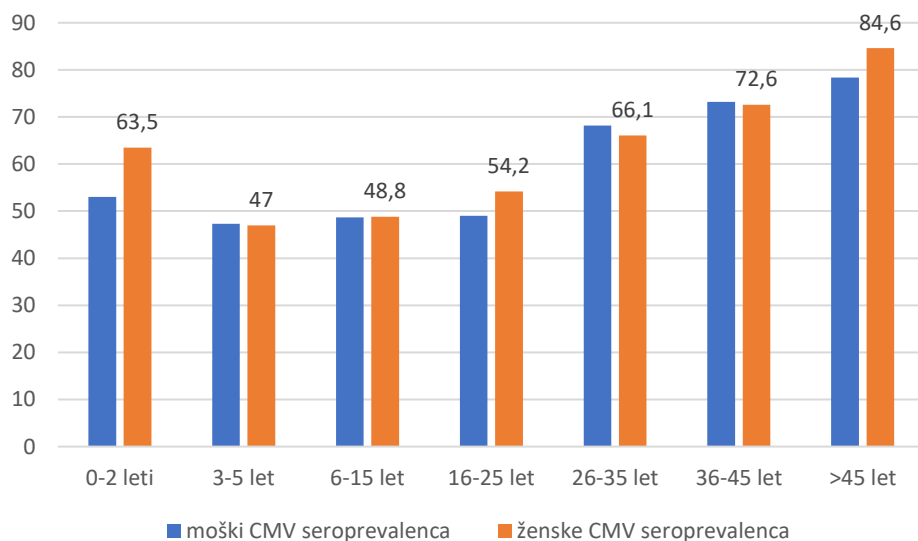
Citomegalovirus, imenovan tudi humani herpesvirus-5 (HHV-5), spada v družino *Herpesviridae*, poddružino *Betaherpesvirinae* in je pomemben človeški patogen, ki povzroča različne bolezni, kot so; mononukleozni podobna bolezen, pljučnica, kongenitalna CMV okužba, ki lahko vodi v splav, zaostalost in okvare sluha. Je pomemben patogen pri osebah z oslabljenim imunskim sistemom. Zaradi različnih bolezenskih oblik, ki jih virus povzroča, sta diagnostika in klinični pomen večplastna.

Uvod

Citomegalovirus (CMV), je največji med humanimi herpesvirusi. Gre za viruse z ovojnico, pleomorfne do sferične oblike, velikosti 150-200 nanometrov (1). Genom predstavlja dvojno-vijačna DNA molekula velikosti 235 kilo baznih parov, ki kodira 208 beljakovin.

Primarna okužba je sistemska, v večini primerov pa poteka asimptomatsko. Po primarni okužbi virus postane latenten v hematopoetskih progenitornih celicah, zaradi česar se lahko večkrat reaktivira. Možna je ponovna okužba z drugim eksogenim sevom. Po primarni okužbi pride do aktivacije protitelesnega in celičnega imunskega odziva, slednji pa ima ključni pomen pri zaježitvi okužbe. CMV je ubikvitaren virus. Na osnovi sistematičnih preglednih člankov in meta analiz povprečna svetovna CMV seroprevalenca znaša 83 % (2). Serorevalenca se močno razlikuje med različnimi regijami sveta in znaša med 66 % in 90 %, med ženskami v rodni dobi glede na geografsko področje pa znaša med 45 % in 100 % (3-5). Za prenos okužbe je potreben večkrat

tesen stik, ob okužbi je CMV prisoten v krvi, slini, urinu, materinem mleku, semenski tekočini, bronhoalveolarnem izpirku in blatu. Možen je prenos tudi preko posteljice na plod, med porodom in v zgodnjem obdobju po porodu, ter s krvjo in presajenimi organi.



Graf 1. Seroprevalenca CMV po starosti in spolu, po podatkih Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, za obdobje 2015 do 2024.

Diagnostika

Diagnostika okužbe s CMV vključuje več metodologij, vsaka med njimi pa se uporablja glede na klinični kontekst.

Serološke preiskave: Odkrivanje specifičnih protiteles razredov IgG in IgM proti CMV. Odkrivanje protiteles IgG se uporablja predvsem pred presaditvijo za določitev pretekle izpostavljenosti. Protitelesa razreda IgM kažejo na akutno okužbo, kar je zelo pomembno pri diagnostiki akutne okužbe v nosečnosti, zaradi možnosti prenosa okužbe na plod (kongenitalna okužba). Za približno časovno opredelitev okužbe CMV, še posebej pri nosečnicah, določamo avidnost protiteles IgG. Visoka IgG avidnost nam kaže na okužbo v preteklosti, nizka pa na nedavno okužbo.

Molekularna diagnostika: kvantitativno določanje bremena CMV z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) v vzorcih plazme je ključnega pomena pri prejemnikih presadkov ter pri vodenju preventivnega zdravljenja in spremljanju odziva na protivirusno zdravljenje. Kvantitativno določanje CMV bremena tudi iz urina novorojenčkov ali amnijske tekočine je pomembno pri sumu na prirojeno okužbo s CMV. Poleg tega je določanje bremena CMV pomembno tudi pri osebah s CMV kolitisom, na podlagi česar se uvede zdravljenje in spremljanje učinkovitosti zdravljenja s spremljanjem virusnega bremena.

Histopatologija: Pregled tkiva z značilnimi "znotrajceličnimi vključki", ki so znak okužbe s CMV. Z imunohistokemično metodo barvamo antigene CMV.

Kultivacija virusa na celičnih kulturah: CMV je možno gojiti na mononuklearnih celicah periferne krvi. Čeprav je metoda manj občutljiva in ima daljši čas do rezultata, pa z njo lahko dokažemo pomnoževanje virusa. "*Shell vial*" celična kultura iz humanih embrionalnih pljučnih fibroblastov (MRC-5) je primerna za namnoževanje CMV pri sumu na kongenitalno okužbo ploda, kjer nato po 72-ih urah inkubacije, z uporabo imunofluorescence dokažemo antigene CMV, oziroma akutno okužbo s CMV. To metodo je v zadnjem času nadomestila, hitrejša in bolj občutljiva molekularna metoda PCR, saj je celična kultura dlje trajajoča, zahtevnejša in slabše občutljiva.

Dokaz antigena pp65: Gre za metodo dokazovanja zgodnjega antigena pp65 CMV v levkocitih periferne krvi. Metoda je v zadnjem desetletju, z uveljavitvijo molekularnih metod, izgubila na pomembnosti dokazovanja akutne CMV okužbe.

Klinični pomen citomegalovirusa

Okužba s CMV je klinično zelo pomembna pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom, ker je povezana z visoko obolevnostjo in umrljivostjo (6-8). Imunsko oslabljeni posamezniki, kot so tisti, ki jim presadijo krvotvorne matične celice (kostni mozeg) ali organe, bolniki s hematološkimi malignimi boleznimi, okužbo s humanim virusom imunske pomanjkljivosti (HIV) ali tisti, ki jemljejo imunosupresivna zdravila, so še posebej občutljivi na reaktivacijo in bolezen CMV.

Citomegalovirus lahko povzroči širok nabor hudih organskih bolezni, vključno s pljučnico, boleznimi prebavil, encefalitisom in retinitisom. Pljučnica CMV je povezana z visoko stopnjo umrljivosti, zlasti pri bolnikih s hematološkimi malignimi boleznimi. Klinična slika okužbe s CMV se razlikuje glede na osnovno imunsko pomanjkljivost in primarno bolezen, zaradi česar sta diagnoza in zdravljenje težavna. Ameriško združenje za infekcijske bolezni (IDSA) in Ameriško združenje za mikrobiologijo (ASM) priporočata spremljanje virusnega bremena CMV z uporabo kvantitativnih molekularnih metod PCR, za vodenje preventivnega zdravljenja in spremljanje odziva na protivirusno zdravljenje pri bolnikih po transplantaciji. Valganciklovir in ganciklovir se uporabljata za protivirusno zdravljenje, maribavir pa kot alternativa za bolnike, ki se ne odzivajo na druga protivirusna zdravila.

Citomegalovirus je najpogostejši virusni vzrok virusne okužbe ploda v maternici (9, 10). Prirojena okužba s CMV je pomemben javnozdravstveni problem v razvitem svetu, z incidenco 5-7/1.000 živorojenih otrok. Približno 20 % nosečnic s primarno okužbo ima simptome. Gre za povečini gripi oziroma infekcijski mononukleozni podoben sindrom s povišano telesno temperaturo, utrujenostjo, bolečinami v mišicah, povečanimi vratnimi bezgavkami, vnetjem žrela, glavobolom, redkeje s povečanimi jetri in vranico, hepatitisom, pljučnico, kožnim izpuščajem. CMV je najpogostejši negenetski vzrok sezorinevralne naglušnosti, nevroloških nepravilnosti in umske zaostalosti, hkrati pa je vzrok tudi za nedonošenost, smrt ploda v maternici in umrljivost novorojenčkov. Simptome ob rojstvu ima do 15 % otrok mater s potrjeno okužbo v prvem trimesečju nosečnosti. Smrtnost novorojenčkov s simptomi je 5-15 %. Pri novorojenčkih s simptomi pride v 40-60 % do trajnih posledic, od katerih je najpogostejša senzorinevralna naglušnost, pogoste pa so še: majhnost za gestacijsko starost, mikrocefalija, hepatomegalija, splenomegalija, petehije, zlatenica, trombocitopenija in anemija. Ocene resnosti okužbe in možnih posledic temeljijo predvsem na časovni opredelitvi okužbe nosečnice, prisotnosti in vrsti nepravilnosti pri plodu in laboratorijskih parametrih.

Diagnozo prirojene okužbe se lahko postavi že v nosečnosti ali po porodu. Diagnosticiranje pred porodom vključuje ultrazvočni pregled, serološko testiranje matere in dokaz akutne okužbe z nizko avidnostjo protiteles IgG, z magnetorezonančnim slikanjem (MRI) ploda, ter dokazom

nukleinske kisline CMV z metodo PCR iz amnijske tekočine, odvzete med amniocentezo. Potrditev okužbe po rojstvu je možna iz urina in sline novorojenčka, odvzetih čimprej po porodu, ali vsaj do 21 dni po porodu, prav tako pa je diagnostika CMV možna tudi iz suhe kaplje krvi (Guthrijeva kartica), vendar je ta metoda manj občutljiva od dokazovanja virusa iz svežega vzorca.

Reaktivacija CMV se nanaša na proces, v katerem se latentni virus, ki se vgradi v celice mieloidne vrste, vključno s hematopoetskimi matičnimi celicami in monociti, ponovno začne aktivno razmnoževati. Reaktivacija lahko privede do nastanka klinične bolezni, zlasti pri posameznikih z oslabelem imunskim sistemom, predvsem pri bolnikih po transplantacijah in kritično bolnih osebah. V kontekstu presaditve organa, sta ishemično-reperfuzijska poškodba in zdravljenje z imunosupresivnimi zdravili pomembna sprožilca za reaktivacijo CMV. Reaktivacija CMV je povezana s pomembno obolevnostjo in umrljivostjo, zlasti pri bolnikih po alogenski presaditvi hematopoetičnih matičnih celic. Je glavni vzrok za virusne zaplete po presaditvi. Razumevanje molekularnih mehanizmov, na katerih temelji reaktivacija CMV, in vpliva vnetnih signalov, je ključnega pomena za razvoj ciljno usmerjenih terapevtskih strategij za preprečevanje in nadzor reaktivacije CMV pri ranljivih populacijah bolnikov.

Literatura

1. Dioverti MV, Razonable RR. Cytomegalovirus. *Microbiol Spectr.* (2016) 4(4).
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0022-2015>
2. Lachmann R, Loenenbach A, Waterboer T, Brenner N, Pawlita M, Michel A, et al. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany. *PLoS One.* (2018) 13(7):e0200267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200267>
3. Ben Shoham A, Schlesinger Y, Miskin I, Kalderon Z, Michaelson-Cohen R, Wiener-Well Y. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence among women at childbearing age, maternal and congenital CMV infection: policy implications of a descriptive, retrospective, community-based study. *Isr J Health Policy Res.* (2023) 12(1):16.
<https://doi.org/10.1186/s13584-023-00566-9>

4. Huang Y, Li T, Yu H, Tang J, Song Q, Guo X, et al. Maternal CMV seroprevalence rate in early gestation and congenital cytomegalovirus infection in a Chinese population. *Emerg Microbes Infect.* (2021) 10(1):1824-31.
<https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1969290>
5. Razonable RR, Inoue N, Pinninti SG, Boppana SB, Lazzarotto T, Gabrielli L, et al. Clinical Diagnostic Testing for Human Cytomegalovirus Infections. *J Infect Dis.* (2020) 221(Suppl 1):S74-S85. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz601>
6. Lautenschlager I, Loginov R, Makisalo H, Hockerstedt K. Prospective long-term study on primary CMV infections in adult liver transplant (D+/R-) patients after valganciclovir prophylaxis. *J Clin Virol.* (2015) 71:73-5. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.08.009>
7. Lawrence SM, Goshia T, Sinha M, Fraley SI, Williams M. Decoding human cytomegalovirus for the development of innovative diagnostics to detect congenital infection. *Pediatr Res.* (2024) 95(2):532-42. <https://doi.org/10.1038/s41390-023-02957-9>
8. Lino JF, Diniz LMO, Rezende LG, Costa VFT, Romanelli RMC. Diagnosis of congenital infections in premature, low-birthweight newborns with intrauterine growth restriction caused by cytomegalovirus (CMV), herpes simplex virus (HSV), Parvo-B 19, and Zika virus: a systematic review. *J Perinat Med.* (2022) 50(7):993-1000.
<https://doi.org/10.1515/jpm-2021-0244>
9. Vodopivec S. PM, Steblovnik L. Okužba s citomegalovirusom v nosečnosti. *Zdravniški Vestnik.* (2022) 91(3-4):161-72.
10. Paradiz KR, Seme K, Puklavec E, Paro-Panjan D, Poljak M. Prevalence of congenital cytomegalovirus infection in Slovenia: a study on 2,841 newborns. *J Med Virol.* (2012) 84(1):109-15. <https://doi.org/10.1002/jmv.22230>

Okužbe s citomegalovirusom v nosečnosti in pri novorojenčku

Matevž Trdan

Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana

matevz.trdan@gmail.com

Citomegalovirus (CMV), podobno kot drugi člani družine herpesvirusov, okuži skoraj vse ljudi vsaj enkrat v življenju. Zaradi dolgotrajnega sožitja med virusom in gostiteljem obstaja več tisoč genetsko različnih sevov, ki krožijo v populaciji. Pri imunokompetentnih gostiteljih povzroča večinoma subklinične okužbe, nosečnice niso izjema. Vendar lahko okužba med nosečnostjo povzroči resne zaplete pri plodu.

Prirojena okužba s CMV

Prirojena okužba nastane zaradi transplacentarnega prenosa virusa in se pojavlja pri približno 1 % novorojenčkov. Prenos se lahko zgodi zaradi materine primarne ali neprimarne okužbe.

Pri primarnih okužbah je prenos na plod pogostejši, v 30 % do 40 % primerov. Gestacijska starost pomembno vpliva na tveganje za prenos, pogostejši je z naraščajočo gestacijsko starostjo. Vendar pa je okužba v zgodnejši gestaciji povezana s težjo obliko bolezni, slabšim izidom. Pomembno je poudariti, da čas, v katerem je prišlo do serokonverzije pri materi, ne sovпада nujno s časom okužbe ploda.

Prirojena okužba lahko nastane tudi kot posledica materine neprimarne okužbe, ob reaktivaciji predhodne okužbe ali ponovni okužbi z enakim oziroma drugim sevom. Tudi v teh primerih lahko pride do klinično izražene okužbe in dolgoročne posledice, kot je izguba sluha, se enako pogoste, kot pri otrocih, okuženih s primarno okužbo. Zato domneva, da so hujše simptomatske prirojene okužbe pri novorojenčkih posledica le primarne materine okužbe, ni več splošno sprejeta. Verjetno pa obstoječa materina imunost vsaj do neke mere spremeni potek okužbe pri materi in razvijajočem se plodu. Raziskave nakazujejo, da ko virus enkrat vstopi v plod, ravnovesje med

plodovo imunostjo, preneseno materino imunostjo in virusnim inokulomom določa obseg in resnost okužbe.

Stopnja imunosti pri ženskah v rodni dobi, ki je pomemben dejavnik pri določanju pojavnosti prirojenih in pridobljenih okužb s CMV, se močno razlikuje med različnimi populacijami. Prirojeni prenos je pogostejši na območjih z visoko seroprevalenco CMV, kar kaže na povezavo med tveganjem izpostavljenosti in deležem okužb.

CMV je genetsko izjemno raznolik virus. Hipoteza je, da imajo nekateri sevi večjo sposobnost okužbe posteljice oz. vstopa v plodov krvni obtok. Pri razumevanju vloge posteljice pri kongenitalni okužbi s CMV je bilo ugotovljeno, da lahko imunska toleranca posteljice omejuje učinkovito odstranitev virusa. Teža prenatalne okužbe se v času nosečnosti lahko odraža s pojavom mikrocefalije z ali brez cerebralne kalcifikacije, intrauterinim zastojem v rasti in posledično nedonošenostjo.

Skoraj 90 % novorojenčkov s prirojeno CMV okužbo ob rojstvu nima kliničnih znakov in njihov dolgoročni izid je precej boljši. Kljub temu pa ima 6 % do 15 % teh otrok kasnejši pojav razvojnih nepravilnosti, kot so izguba sluha, redkeje tudi mikrocefalijo, motorično okvaro, duševno zaostalost, horiorenitis, zobne nepravilnosti in druge posledice, za katere so sprva mislili, da prizadenejo le otroke s simptomatsko prirojeno okužbo. Te nepravilnosti se običajno pokažejo v prvih dveh letih življenja.

Pri simptomatski prirojeni okužbi s CMV najpogostejše najdemo hepatomegalijo, splenomegalijo, mikrocefalijo, ikterus in petehije. Med najhuje prizadetimi otroki so stopnje umrljivosti od 10 % do 30 %, čeprav jih manj kot 5 % umre v dobi novorojenčka.

Edinstvena značilnost prirojene okužbe s CMV pa je prizadetost osrednjega živčnega sistema, ki se zelo redko pojavi celo pri najtežje imunsko oslabljenih odraslih. Ni povsem jasno, zakaj so plodovi in novorojenčkovi možgani bolj dovzetni za okužbo s CMV, predvideva pa se, da so razvijajoče se celice osrednjega živčnega sistema posebej občutljive na litične ali morda apoptotske učinke CMV. Pogosto opažene nepravilnosti so periventrikularne kalcifikacije,

ventrikulomegalija in izguba ločnice med belo in sivo možganovino. Podrobnejše raziskave so razkrile izgubo normalne arhitekture možganov z motnjami v radialni migraciji nevronov in hipoplazijo malih možganov.

Poleg tega je prizadetost osrednjega živčnega sistema pogosto povezana z napredovanjem bolezni, tudi ko ni vidnega očitnega napredovanja strukturnih poškodb živčevja. Napredujoča izguba sluha v prvih letih življenja je najpogostejši zaplet prirojene CMV okužbe, pogosto tudi pri otrocih s klinično nemo okužbo. Velja za enega najpomembnejših vzrokov naglušnosti v otroštvu. CMV lahko povzroči izgubo sluha na več načinov – neposredno s poškodbo slušnih celic, prek vnetja ali z vplivom na razvoj živčnih povezav. Pogostost in resnost okvare sluha sta večji pri simptomatski okužbi (23–58 %) v primerjavi z asimptomatsko (6–15 %). Pri visokem deležu otrok z izgubo sluha so ugotovili tudi hude motnje vestibularne funkcije. Napovedni dejavniki izgube sluha pri otrocih s simptomatsko okužbo so intrauterini zastoj rasti, petehije, hepatosplenomegalija, trombocitopenija in intrakranialne kalcifikacije. Ti dejavniki so prav tako povezani z bistveno višjimi virusnimi obremenitvami pri novorojenčkih.

Pridobljena okužba s CMV

Pridobljene okužbe s CMV so lahko posledica izpostavljenosti okuženemu porodnemu kanalu, prenosa prek materinega ali darovanega ženskega mleka, prenosa virusa preko transfuzij krvnih pripravkov ali horizontalnega prenosa s strani osebj.

Izpostavljenost CMV v materinem genitalnem traktu povzroči perinatalno okužbo v 30–50 % primerov. S transfuzijo pridobljene perinatalne okužbe s CMV so zaradi sodobnih praks v transfuzijski medicini redke. Zavedajoč se pomena preventive, nekatere porodnišnice uporabljajo izključno seronegativno krvi za vse transfuzije, ne glede na porodno težo novorojenčka ali materin imunski status. Prenosi s strani zdravstvenih delavcev so ob upoštevanju vseh higienskih ukrepov prav tako redki.

Večina otrok s pridobljeno CMV okužbo je brez simptomov, pridobljena okužba pri donošenih in sicer zdravih otrocih običajno tudi ne vpliva na rast, zaznavne funkcije, motorični ali psihosocialni razvoj.

Pri nedonošenčkih in bolnih donošenih otrocih pa ima postnatalna okužba s CMV pogosto hujši potek – kaže se s hepatosplenomegalijo, nevtropenijo, limfocitozo in trombocitopenijo, kar sovпада z začetkom izločanja virusa. Okuženi otroci običajno potrebujejo daljše zdravljenje s kisikom, pri nedonošenčkih CMV okužba poveča tveganje za bronhopulmonalno displazijo in možne nevrološke posledice, vključno z izgubo sluha.

Preprečevanje, diagnostika in zdravljenje okužb

Ker cepivo proti CMV še ni na voljo, ostajajo ključni ukrepi za preprečevanje okužbe s CMV predvsem osveščanje, ustrezna higiena, izogibanje tveganim stikom in zaščita ranljivih skupin, med katere sodijo tudi nosečnice.

Večina primarnih okužb s CMV pri nosečnicah poteka brez simptomov. Določitev serološkega statusa CMV bi bila ključna za prepoznavo žensk, ki so med nosečnostjo izpostavljene tveganju za primarno okužbo. A vendar serološko presejanje ni del rutinske klinične prakse, tudi zanesljivi testi za napoved prenosa okužbe na plod ne obstajajo.

Glede na objavljena priporočila je serološko testiranje indicirano pri nosečnicah s simptomi, ki so združljivi s primarno okužbo s CMV, kot so dolgotrajna zmerne vročina, mononukleozni podoben sindrom ali povišane vrednosti jetrnih transaminaz. Prav tako se lahko CMV serološko testiranje opravi v primeru ultrazvočno ugotovljenih nepravilnosti, ki nakazujejo možno okužbo ploda. V takšnih primerih negativni serološki izvid izključi okužbo ploda, medtem ko pri pozitivnih IgG protitelesih, ne glede na vrednost IgM ali avidnost IgG, okužbe ploda ni mogoče izključiti. V primerih dokazane materine primarne okužbe v prvem trimesečju se svetuje zdravljenje z valaciclovirjem do amniocenteze v sklopu sekundarne preventive za zmanjšanje tveganja za vertikalni prenos virusa na plod. Prenatalna diagnostika temelji na amniocentezi in PCR analizi

plodovnice, ki ima ob pravem času testiranja visoko občutljivost. Slikovne preiskave, kot sta ultrazvok in MRI, omogočajo zaznavanje morebitnih nepravilnosti pri plodu.

Diagnoza prirojene okužbe s CMV pri novorojenčku se izvaja z dokazovanjem prisotnosti CMV DNK v urinu ali slini s pomočjo PCR metode do 3. tedna starosti. Kasnejši dokaz prisotnosti virusa nakazuje pridobljeno okužbo. Obe vrsti vzorcev sta zelo občutljivi in specifični ter enostavni za odvzem. Pomembno je upoštevati, da je pri novorojenčkih, ki jih dojijo CMV-seropozitivne matere, test slin lahko lažno pozitiven zaradi izločanja virusa v materinem mleku, zato je treba pozitiven rezultat potrditi z analizo urina.

PCR analiza suhe kapljice krvi, odvzete ob rojstvu za potrebe metabolnega presejanja, predstavlja zlati standard za retrospektivno diagnozo prirojene CMV, vendar lahko z njo spregledamo nekatere primere.

Izločanje virusa traja več let pri kongenitalnih, perinatalnih in zgodnjih postnatalnih okužbah, bistveno dlje kot pri okuženih starejših otrocih ali odraslih. Prav tako je količina izločenega virusa pri teh okužbah občutno večja. Znana je povezava med številom kopij virusne DNA v periferni krvi in dolgoročnim izidom, kar nakazuje, da bi lahko na ta način spremljali otroke s prirojeno okužbo, prepoznali tiste z večjim tveganjem za posledice ter jih obravnavali kot potencialne kandidate za zdravljenje. Kljub temu pa določitev virusne obremenitve v periferni krvi pri prirojenih okužbah ni zadostna metoda za oceno tveganja za izgubo sluha.

Podatkov o varnosti in učinkovitosti protivirusnega zdravljenja nosečnic za zdravljenje prirojene okužbe s CMV še ni. Za zdravljenje hudih in ogrožajočih okužb otrok imamo omejen nabor protivirusnih zdravil. Glede zdravljenja blažjih oblik bolezni ob rojstvu, kot je izolirana izguba sluha, ni povsem enotnih mnenj. Previdnost izhaja iz pomislekov zaradi pomanjkanja dolgoročnih varnostnih podatkov ter ugotovitev gonadotoksičnosti in rakotvornosti ganciklovirja v študijah na

živalih. Dosedanje raziskave ne podpirajo zdravljenja asimptomatskih novorojenčkov. Dokazi o zdravljenju simptomatskih postnatalnih okužb pri nedonošenčkih so omejeni, v nekaterih primerih so se pokazale koristi zdravljenja s ganciklovirjem, zlasti pri nedonošenčkih s sepso, povezano s CMV. Vendar pa je pogosto težko določiti, ali je CMV dejanski vzrok kliničnega stanja, saj imajo ti otroci pogosto pridružene zdravstvene težave. Prenos virusa preko materinega mleka predstavlja določeno tveganje za nedonošenčke. Znano je, da zamrzovanje mleka zmanjša kužnost virusa, medtem ko primerna kratkotrajna toplotna obdelava lahko virus popolnoma uniči, ne da bi pri tem vplivala na hranilne in imunske lastnosti mleka.

Otroci s prirojeno CMV morajo biti spremljani vsaj do šestega leta starosti, da se zagotovi ustrezno specializirano obravnavo. Diagnoza okužbe s CMV v prenatalnem ali neonatalnem obdobju, skupaj z vsemi negotovostmi glede prihodnosti, je lahko za starše zelo obremenjujoča in psihološka podpora je lahko zelo koristna.

Literatura

1. Perman SR, Gantt S. Cytomegalovirus. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado Y, eds. Remington and Klein's Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. 10th ed. Philadelphia: Elsevier; 2024. p. 640–87.
2. Leruez-Ville M, Chatzakis C, Lilleri D, Blazquez-Gamero D, Alarcon A, Bourgon N, et al. Consensus recommendation for prenatal, neonatal and postnatal management of congenital cytomegalovirus infection from the European congenital infection initiative (ECCI). Lancet Reg Health Eur. 2024;40:100892.
3. Vodopivec S, Petrovec M, Steblovnik L. Okužba s citomegalovirusom v nosečnosti. Zdrav Vestn. 2022;91(3–4):161–72.
4. Eržen N, Korpar B, Mramor M, Battelino S, Markelj Š, Golli T, et al. Prirojena okužba s citomegalovirusom: usmerjeno presejanje novorojenčkov in protokol obravnave. Zdrav Vestn. 2024;93(5–6):187–97.

Zagotavljanje CMV seronegativnih krvnih komponent na Zavodu RS za transfuzijsko medicino

Urška Rahne Potokar

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

urska.rahne@ztm.si

Uvod

Humani citomegalovirus (CMV) je dvovijačni DNA virus iz skupine herpes virusov (HHV-5) in je specifičen za človeka. Prenaša se s z neposrednim stikom in iatrogeno, s transfuzijo krvnih komponent in presaditvijo krvotvornih matičnih celic ali organov. Primarna okužba pogosto poteka brez simptomov ali v blagi obliki sindroma mononukleoze. V otroštvu se virus najpogosteje prenaša s slino, v odraslem obdobju pa navadno s spolnim stikom. Po primarni okužbi virus ostane v telesu v latentni obliki v CD 34+ hemopoetskih progenitornih (krvotvornih matičnih celicah, KMC) celicah v kostnem mozgu in monocitih v periferni krvi in se lahko občasno reaktivira. Po preboleli okužbi se v 4-8 tednih razvijejo specifična protitelesa, ki ostanejo prisotna vse življenje. Pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom lahko pride do simptomatske virusne okužbe ali virusne reaktivacije, ki prizadene številne organe. Najpogostejša sta intersticijska pljučnica in hepatitis, lahko pa gre tudi za encefalitis, retinitis, enteritis ali prizadetost kostnega mozga s posledično trombocitopenijo, levkopenijo in anemijo(1). Bolniki, ki imajo tveganje za težek potek okužbe s CMV pogosto potrebujejo številne transfuzije krvnih komponent.

Najpomembnejši pristopi k preprečevanju prenosa CMV s transfuzijo so izbira varnih dajalcev, serološko testiranje na prisotnost specifičnih protiteles proti CMV, odstranjevanje levkocitov iz krvnih komponent, inaktiviranje patogenov in racionalna uporaba krvi. Nobeden od omenjenih ukrepov ne zagotavlja 100 odstotne varnosti, lahko pa se med seboj dopolnjujejo.

Uporaba krvnih komponent CMV seronegativnih dajalcev je že dolgo uveljavljeni pristop za zmanjševanje tveganja za prenos CMV s transfuzijo pri bolnikih z velikim tveganjem za težji potek okužbe. Kljub uporabi krvnih komponent z odstranjenimi levkociti in hkratni uporabi CMV

seronegativnih krvnih komponent za skupine bolnikov z večjim tveganjem za okužbo, je še vedno možen prenos CMV s transfuzijo. Po primarni okužbi krvodajalca je v obdobju diagnostičnega okna virus prisoten v plazmi, protitelesa pa se še niso razvila oz. je njihova koncentracija še nezaznavna. Ocenjeni odstotek serokonverzije v odrasli populaciji je 0,2-1,2% letno (2,3). Virus je v plazmi prisoten tudi ob reaktivaciji CMV.

Metode

Za zagotavljanje CMV seronegativnih krvnih komponent na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (ZTM) uporabljamo serološke teste za določanje specifičnih protiteles IgG in IgM anti-CMV. Testa Abbott Architect CMV IgG in Abbott Architect CMV IgM imata visoko občutljivost nad 97% in specifičnost nad 98%.

Testiranje praviloma izvedemo ob naročilu krvne komponente. Za testiranje izberemo enote ustrezne krvne skupine, ki so bile odvzete krvodajalcu s predhodno določenim negativnim serološkim CMV statusom ali pa serološki CMV status še ni bil določen. Skupni čas testiranja je približno 1 ura in 45 min, zunaj rednega delovnega časa se lahko ta čas podaljša do 1 ure, kolikor je potrebno za vpoklic laboratorijskega osebja iz službe stalne pripravljenosti. Skupni čas od naročila do izdaje (vključno s predtransfuzijskim testiranjem) je lahko do 4 ure. Ob nujni transfuziji je testiranje smiselno samo takrat, ko je tveganje zaradi odložitve transfuzije manjše od tveganja v povezavi s prenosom CMV.

Rezultati

V tabeli 1. so prikazani rezultati presejalnega testiranja enot krvi na prisotnost specifičnih protiteles anti-CMV IgG in IgM v 15 letnem obdobju od 2010 do 2024. Letno število testiranih enot krvi se je gibalo od najvišjega 3451 v letu 2018 do najnižjega 1153 v letu 2011. Število testiranih enot je odvisno od števila bolnikov z visokim tveganjem za težek potek CMV okužbe za katere lečeči zdravniki naročajo CMV seronegativne krvne komponente.

Tabela 1: Testiranje enot krvi na prisotnost specifičnih protiteles anti-CMV IgG in IgM na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v obdobju od leta 2010 do 2024.

ANTI-CMV TESTIRANE ENOTE KRVİ					
LETO	ŠT. TEST. ENOT KRVİ	ŠT. POZ	% POZ	ŠT. NEG	% NEG
2010	1541	1068	69%	473	31%
2011	1153	753	65%	400	35%
2012	2280	1513	66%	767	34%
2013	1798	1137	63%	661	37%
2014	1798	1108	62%	690	38%
2015	1864	1147	62%	717	38%
2016	2065	1220	59%	845	41%
2017	2415	1392	58%	1023	42%
2018	3451	1551	45%	1900	55%
2019	3097	1251	40%	1846	60%
2020	2561	969	38%	1592	62%
2021	2103	673	32%	1430	68%
2022	2355	773	33%	1582	67%
2023	2350	741	32%	1609	68%
2024	1974	597	30%	1377	70%
SKUPAJ	32805	15893	/	16912	/

V tabeli 2. so rezultati testiranja prikazani glede na število krvodajalcev v letih od 2010 do 2024. Število testiranih krvodajalcev je nižje od števila testiranih odvzetih enot krvi, saj krvodajalec lahko daruje kri večkrat letno. Ker za testiranje izberemo odvzete enote krvi specifični skupini krvodajalcev, ki so imeli predhodno negativni anti-CMV status ali CMV status še ni bil določen, rezultati ne odražajo prevalence protiteles anti-CMV med vsemi krvodajalci.

Presejalno testiranje za iskanje CMV seronegativnih krvnih komponent na ZTM izvajamo od leta 1991, zato ima velik del krvodajalcev že določen CMV serološki status. Od leta 2018 za testiranje izberemo več enot, ki so bile odvzete krvodajalcem s predhodno negativnim CMV, kot neznanim statusom, kar se odraža na rezultatih testiranja. Največ serološko pozitivnih krvodajalcev 69% je bilo leta 2010, najmanj 34% v letu 2024. V celotnem obdobju smo pri 19 krvodajalcih ugotovili serokonverzijo v posameznem letu.

Tabela 2: Število testiranih krvodajalcev na prisotnost specifičnih protiteles anti-CMV IgG in IgM na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v obdobju od leta 2010 do 2024.

ANTI-CMV TESTIRANI KRVODAJALCI						
LETO	ŠT. TEST. KRVODAJALCEV	POZ (konec leta)	% POZ	NEG (konec leta)	% NEG	SEROKONVERZIJA
2010	1538	1068	69%	470	31%	0
2011	1151	753	65%	398	35%	0
2012	2254	1511	67%	743	33%	0
2013	1774	1137	64%	637	36%	0
2014	1778	1108	62%	670	38%	1
2015	1844	1145	62%	699	38%	0
2016	2044	1220	60%	824	40%	0
2017	2354	1392	59%	962	41%	1
2018	3203	1550	48%	1653	52%	3
2019	2819	1251	44%	1568	56%	3
2020	2317	969	42%	1348	58%	1
2021	1865	673	36%	1192	64%	0
2022	2097	773	37%	1324	63%	6
2023	2048	741	36%	1307	64%	3
2024	1767	597	34%	1170	66%	1
SKUPAJ	30853	15888	/	14965	/	19

Razprava in zaključki

Zagotavljanje krvnih komponent CMV seronegativnih dajalcev in odstranitev levkocitov iz komponent s filtracijo sta učinkoviti metodi za preprečevanje s transfuzijo prenešene okužbe s CMV. Tveganja za prenos pa ne moremo popolnoma izključiti pri akutni okužbi krvodajalca v diagnostičnem oknu, ko je CMV DNA prisotna v plazmi, protitelesa pa se še niso razvila. Ugotovljeno je bilo, da v enem letu serokonvertira 1,1% krvodajalcev (4, 5). Visoke koncentracije CMV DNA so prisotne tudi pri primarni okužbi v obdobju serokonverzije.

Kljub tveganju je danes s transfuzijo prenesena okužba s CMV zelo redka in po izračunu naj bi bilo preostalo tveganje po uvedbi učinkovite filtracije krvnih komponent manj kot 1 na milijon transfundiranih komponent (6).

Literatura

1. Cukjati M, Rajić V, Paro Panjan D, Premru Sršen T, Štucin Gantar I, Grošelj Grenc M, et al. Smernice za preprečevanje prenosa CMVs transfuzijo krvnih komponent. Zdrav Vestn 2013; 82:367-77.
2. Roback JD, Drew WL, Laycock ME, Todd D, Hillyer CD, Busch MP. CMV DNA is rarely detected in healthy blood donors using validated PCR assays. Transfusion 2003; 43: 314–21.
3. Hecker M, Qiu D, Marquardt K, Bein G, Hackstein H. Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors. Vox Sang 2004; 86: 41–4.
4. Ziemann M, Unmack A, Steppat D, Juhl D, Goerg S, Hennig H. The natural course of primary cytomegalovirus infection in blood donors. Vox Sanguinis 2010; 99: 24–33.
5. Ziemann M, Juhl D, Brockmann C, Goerg S, Hennig H. Infectivity of blood products containing cytomegalovirus DNA: results of a lookback study in nonimmunocompromised patients. Transfusion 2017; 57:1691–1698.
6. Seed CR, Wong J, Polizzotto MN, Faddy H, Keller AJ, Pink J. The residual risk of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection associated with leucodepleted blood components. Vox Sang 2015;109(1):11-7.

Varna preskrba s krvjo in CMV

Slavica Stanišić

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

slavica.stanisis@ztm.si

Citomegalovirus (CMV) ali Humani herpesvirus-5 (HHV-5) je dvovijačni DNA virus z lipidno ovojnico iz družine človeških virusov herpesa. Zanj je značilno, da po primarni okužbi vzpostavi trajno latentno okužbo. Primarna okužba je sistemska in večina okuženih zdravih posameznikov ne razvije simptomov. Včasih se lahko pojavijo blagi simptomi podobni mononukleozi. Virus se pomnožuje v žlezah slinavkah, ledvicah in dihalnih poteh, v latentni obliki ostane v CD 34+ celicah v kostnem mozgu in monocitih v periferni krvi. Po preboleli primarni okužbi s CMV lahko pride do ponovne aktivacije latentnega virusa ali okužbe z novim sevom CMV. CMV je razširjen po vsem svetu. Prevalenca CMV-seropozitivnosti je običajno večja pri ženskah, starejših osebah, ljudeh z nižjim socialno-ekonomskim statusom ter v državah v razvoju. Povezava med temi dejavniki verjetni izhaja iz življenjskega sloga, gostote prebivalstva, spolne aktivnosti, števila otrok in prakse vzgoje. CMV se najpogosteje prenaša preko stika s kontaminiranimi predmeti ali telesnimi tekočinami, kot so slina, urin, solze, semenska tekočina, izločki materničnega vratu in materino mleko. Možen je tudi iatrogeni prenos ki vključuje transfuzijo krvi ali presaditev krvotvornih matičnih celic ter presaditev solidnih organov do CMV-seropozitivnega darovalca. CMV se lahko prenese s transfuzijo celičnih krvnih komponent, kot so eritrociti, trombociti in granulociti. Do sedaj ni bil zabeležen noben primer prenosa CMV s transfuzijo sveže zmrznjene plazme ali plazemskih komponent. Čeprav okužba s CMV pri zdravih posameznikih običajno poteka asimptomatično, med nosečnostjo ali pri osebah z oslabljenim imunskim sistemom lahko povzroči hude zdravstvene težave. Zaradi tega je ključnega pomena, da se pravočasno prepoznajo prejemniki transfuzij, ki spadajo v ogroženo skupino, ter da se za njih zagotovijo ustrezne krvne komponente.

Zmanjšanje tveganja za prenos CMV okužbe

Varna transfuzija se začne z izbiro varnih krvodajalcev. Kri lahko darujejo le zdravi krvodajalci, dobrega splošnega počutja. V primeru akutne virusne okužbe v anamnezi pa mora od prebolele okužbe miniti vsaj 14 dni. Ker je primarna okužba CMV pri večini zdravih oseb asimptomatska, pri pregledu krvodajalcev ni možno ugotoviti CMV okužbe in se lahko virus CMV prenese s krvnimi komponentami CMV seropozitivnega krvodajalca.

Ukrepi, s katerimi se učinkovito zmanjša možnost prenosa virusa CMV, vključujejo odstranjevanje levkocitov iz krvnih komponent, serološko testiranje na prisotnost CMV IgM/IgG protiteles ter redukcijo patogenov. Te ukrepe dopolnjuje preudarno naročanje krvnih komponent in racionalno zdravljenje s krvjo, da se doseže čim bolj varna transfuzija.

Filtriranje krvnih komponent z uporabo levkocitnih filtrov je najuspešnejša metoda za odstranjevanje levkocitov. Cilj je doseči zmanjšanje števila levkocitov na manj kot 1×10^6 na enoto. Na ZTM imamo od leta 2009 na zalogi izključno filtrirane enote eritrocitov in trombocitov ter trombocite pripravljene s postopkom afereze, ki tudi vsebujejo manj kot 1×10^6 levkocitov na enoto. Filtracija se izvaja pred shranjevanjem komponente, kar je bolj učinkovito, kot če bi jo izvedli naknadno med shranjevanjem ali ob postelji bolnika. Manj učinkovite metode za odstranjevanje levkocitov so pranje in zamrzovanje /odmrzovanje ter naknadno pranje eritrocitnih in trombocitnih pripravkov. Te metode niso rutinske in se uporabljajo le v določenih primerih.

Presejalno testiranje krvodajalcev na prisotnost CMV IgM/IgG protiteles je učinkovit način za preprečevanje prenosa CMV s transfuzijo, vendar zaradi možnih lažno negativnih rezultatov pri testiranju krvodajalcev v akutni fazi bolezni ali pri tistih z nizkim titrom protiteles, tveganje prenosa CMV ne moremo popolnoma izključiti.

Eden najbolj učinkovitih ukrepov za preprečevanje prenosa CMV je uporaba različnih tehnologij za redukcijo patogenov. Na ZTM od leta 2009 uporabljamo za enote trombocitov tehnologijo s psoralenom in UVA žarki. Z isto tehnologijo je bila leta 2024 na ZTM uspešno zaključena validacija

postopka redukcije patogenov enot SZP. Tehnologije za redukcijo patogenov v polni krvi in eritrocitih so še vedno v fazi razvoja in v klinični uporabi še niso prisotne.

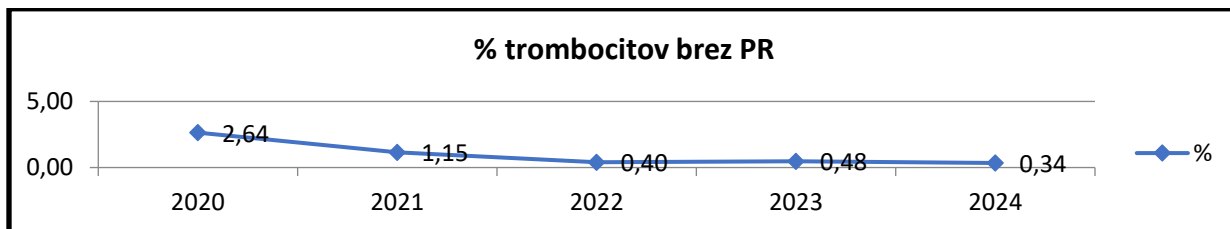


Tabela 1. Odstotek izdanih trombocitnih pripravkov brez patogene redukcije 2020-2024

Smernice za uporabo CMV seronegativnih krvnih komponent se med državami in včasih tudi med regijami iste države precej razlikujejo.

INDIKACIJE	Slovenija (2012)	Združeno kraljestvo (2012)	Avstralija (2020)	Kanada (2017)
Intrauterine transfuzije	DA	DA	DA	DA
Nedonošenčki	DA (porodna teža do 1500g)!	DA	DA	NE
Novorojenčki (do 28 dne od PDP*)		DA	DA	NE
Granulociti	DA	DA	DA	NI OPREDELJENO
Pacienti s pomanjkljivim imunskim sistemom	NE	NE	NE	NE
Pacienti po avtologni presaditvi KMC	NE	NE	NE	NE
Pacienti po alogenski presaditvi KMC	NE	NE	NE	NE
Pacienti po presaditvi solidnih organov	NE	NE	NE	NE
Nosečnice	DA	DA	DA	NE

Tabela 2. Primerjava smernic za uporabo CMV seronegativnih krvnih komponent

Pred naročanjem krvnih komponent je nujno identificirati rizične skupine pacientov in postaviti indikacije za uporabo CMV seronegativnih krvnih komponent. Naročanje ustreznih krvnih komponent za pacienta je v pristojnosti lečečega zdravnika, ki mora ob vsakem naročilu označiti posebno zahtevo na naročilnici. Te zahteve je treba dokumentirati v medicinski dokumentaciji pacienta ter bolnišničnem in transfuzijskem informacijskem sistemu. Zaželeno je, da se tudi pacienta ali njegove bližnje seznani z zahtevami glede uporabe CMV seronegativnih krvnih komponent.

Vsa odstopanja od redne prakse v zvezi z naročanjem, testiranjem, pripravi in transfuziji CMV seronegativnih krvnih komponent se beležijo kot hemovigilančni dogodki in se ustrezno obravnavajo.

Na ZTM si prizadevamo imeti na zalogi dve enoti svežih, do pet dni starih eritrocitov krvne skupine 0, RhD-poz. in 0, RhD-neg. za najbolj nujne primere, ko ni časa za testiranje.

V primeru urgence, ko ustrezne CMV seronegativne enote niso na voljo in bi zamuda s transfuzijo zaradi testiranja lahko ogrozila zdravje in življenje pacienta, se za rizične skupine lahko izda ne testirane eritocite z odstranjeni levkociti. Po podatkih iz Avstralije je možnost prenosa CMV s filtriranimi komponentami krvi zanemarljiva in znaša 1: 13 575 000. Zato večina smernic priporoča uporabo izključno filtriranih enot za rizične skupine pacientov, kot so bolniki po presaditvi KMC in solidnih organov, hemato-onkološki pacienti in pacienti z oslabljenim imunskim sistemom. Za te paciente priprava CMV seronegativnih enot ni potrebna.

Zaključek

Prenosa CMV s transfuzijo krvnih komponent ni mogoče popolnoma preprečiti, vendar se z različnimi ukrepi trudimo to tveganje čim bolj zmanjšati. Novi postopki predelave krvi in napredne tehnologije za redukcijo patogenov, ki bi bile primerne za vse vrste krvnih komponent, bi nas lahko pripeljale zelo blizu cilja zagotavljanja popolnoma varnih krvnih komponent glede prenosa CMV. Do takrat je ključnega pomena upoštevanje smernic za uporabo CMV seronegativnih krvnih komponent ter zagotavljanje teh komponent za paciente iz rizičnih skupin.

Literatura

1. Cukjati M, Rajić V, Paro Panjan D, Premru Sršen T, Štucin Gantar I, Grošelj Grenc M, et al. Smernice za preprečevanje prenosa CMV s transfuzijo krvnih komponent. Zdrav Vestn. 2013;82:367–77.
2. SaBTO Cytomegalovirus tested Blood Components Position Statement; 2012 [cited 2025 March 20]. Available from: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/215125/dh_133086.pdf
3. Australian and New Zealand Society of Blood Transfusion Guidelines for Transfusion and Immunohaematology Practice- revised 2020 [cited 2025 March 20]. Available from: *Guidelines for Transfusion and Immunohaematology Laboratory Practice*
4. National Advisory Committee's statement regarding appropriateness of use of Cytomegalovirus (CMV) seronegative vs CMV safe product; 2017 [cited 2025 March 20]. Available from: <http://www.nacblood.ca/resource/cytomegalovirus>

Diagnostični izzivi pri limfoproliferativnih boleznih (ZHS, HLZ)

Klinika in diagnostični pristop k limfocitnim novotvorbam

Enver Melkić

Univerzitetni klinični center Ljubljana

enver.melkic@kclj.si

Uvod

Limfocitne novotvorbe so heterogena skupina hematoloških malignomov, ki nastanejo zaradi maligne preobrazbe ene celične limfatične vrste; zarodnih celic B, zarodnih celic T, zrelih celic B, zrelih celic T ali (redko) naravnih celic ubijalk (NK celice). So klonske bolezni, ki pripeljejo do nenadzorovanega razraščanja celic limfatičnega tkiva in s tem povezanih težav. Lahko se pojavijo v kateri koli starosti, vendar je pogostokrat značilna bimodalna pojavnost z enim vrhom v zgodnjih letih življenja, drugi pa v srednji starosti. Za bolnike z limfomom so običajno značilni tako imenovani B simptomi.

Primarna diagnostika pri bolniku z novoodkritim malignim limfomom vključuje poleg natančne anamneze in kliničnega pregleda še preiskave osnovne krvne slike in razširjene biokemije, slikovno diagnostiko, histološki pregled tarčnega tkiva, pregled kostnega mozga s citološkim pregledom, histologijo s specifičnim imunohistokemijskimi barvanji, pretočno citometrijo in molekularno ter citogenetsko analizo. Pravilna diagnoza limfoma je ključna, saj se klinični potek, prognoza in zdravljenje limfomov zelo razlikujejo glede na vrsto limfoma.

Klinična slika

Pri agresivnih ali zelo agresivnih limfomih, se težave običajno pojavijo subakutno ali akutno s hitro rastočo maso. Pogostokrat so značilni B simptomi, kot so pogosta in nepojasnjena vročina nad 38 °C, izrazito nočno potenje ali patološko hujšanje za več kot 10 % telesne teže v zadnjih šestih mesecih in/ali sindromom spontane tumorske lize. Primeri agresivnih ali zelo agresivnih tako imenovanih ne Hodgkinovih limfomov (NHL) so difuzni velikocelični limfom B, Burkittov limfom,

limfoblastna levkemija/limfom B in T, limfom zrelih celic T in nekateri drugi periferni limfomi celic T.

Indolentni limfomi se kažejo s počasi rastočo ali več mesecev ali let trajajočo limfadenopatijo, hepatomegalijo, splenomegalijo in/ali citopenijo. Primeri indolentnih NHL so folikularni limfom, kronična limfocitna levkemija/drobnocelični B limfom, indolentni limfom plaščnih celic in limfom obrobnih celic vranice.

Primarna diagnostika limfocitnih novotvorb

Poleg kliničnega pregleda, kjer pri bolniku lahko odkrijemo patološko povečane periferne bezgavke, povečano vranico in/ali jetra je nujno, da opravimo pregled osnovne krvne slike, ki vključuje: hemogram z diferencialno belo krvno sliko in preiskave razširjene biokemije s proteinogramom. Nekatera odstopanja v krvni sliki, kot so anemija, levkocitoza s prevladujočo limfocitozo, povišana vrednost feritina in laktat dehidrogenaze (LDH), prisotnost monoklonskega zobca ali hipogamaglobulinemija, povišana vrednost beta 2 mikroglobulina, znižana vrednost albuminov, so pogosta odstopanja pri aktivni bolezni. Pri bolnikih, ki imajo v periferni krvi izraženo levkocitozo z absolutno limfocitozo, lahko že v primarni diagnostiki opravimo preiskavo pretočne citometrije s katero potrdimo klonsko proliferacijo limfocitov in pogostokrat značilen imunofenotip.

Pri bolnikih, ki imajo tipno povečane periferne bezgavke, opravimo citološko preiskavo vzorca odvzetega s tankoigelnno aspiracijsko biopsijo. V primarni diagnostiki limfomov s citopatološko preiskavo najprej potrdimo ali ovržemo klinični sum na limfom.

Glavni namen citopatološke preiskave je ugotoviti, ali gre za reaktivno limfocitno proliferacijo ali za limfom ter čimbolj natančno opredeliti vrsto limfoma.

V kolikor s citopatološkim pregledom potrdimo klinični sum na limfom, s tem določimo tudi najbolj reprezentativno in najlažje dostopno bezgavko za kirurško biopsijo in histološki pregled. Za dokončno potrditev diagnoze in opredelitev tipa limfoma (po klasifikaciji Svetovne zdravstvene organizacije) pa je nujna histološka preiskava (vključno z imunohistokemičnimi in po potrebi

molekularno biološkimi/genetskimi preiskavami) v celoti odstranjene bezgavke oz. reprezentativnega vzorca obolelega organa.

Presejalnih preiskav na področju malignih limfomov (z izjemo že omenjene diagnostične citološke punkcije povečanih bezgavk) ni.

Nadaljnja diagnostika limfocitni novotvorb

Zanesljiva diagnoza limfoma je možna le na osnovi kliničnih podatkov, mikroskopskega pregleda celičnega vzorca, histološkega pregleda tarčnega tkiva ter dodatnih imunofenotipskih in molekularno ter citogenetskih analiz.

Sam mikroskopski pregled celičnega vzorca in ocene morfologije celic včasih ni zadosti zanesljivo za razlikovanje med reaktivno spremenjenimi limfociti in limfomom. Na osnovi morfologije celic tudi ne moremo zanesljivo potrditi pravilne klasifikacije limfoma. Zato je rutinska uporaba dodatnih imunofenotipskih analiz, ki jih praviloma napravimo s pretočnim citometrom, obvezna.

a. Preiskave kostnega mozga

Citološka in histološka preiskava kostnega mozga sta komplementarni metodi. S hkratno uporabo obeh preiskav povečamo senzitivnost in specifičnost preiskave. Pri diagnostiki limfomov je poleg citološkega pregleda in histologije nujna tudi preiskava pretočne citometrije; »markerji maligni limfomi«. Citološka preiskava kostnega mozga obsega natančen pregled preparatov narejenih iz »odtisnjencev« kostnega mozga pri kateri potrdimo povečano limfocitno proliferacijo z natančnim morfološkim opisom celic.

b. Histološke preiskave kostnega mozga

Pri izbiri preiskav kostnega mozga je poleg citološkega pregleda in imunofenotipizacije, pri postavljanju pravilne diagnoze, ključna tudi biopsija in histološka analiza z imunohistokemijo. Danes praviloma vse maligne limfome opredelimo tudi imunohistološko. Pri tem uporabljamo kombinacije več protiteles, s katerimi se razkrijejo za posamezne maligne limfome značilni vzorci imunoreakcij, ki odločilno pripomorejo k diagnozi. V morfološki diagnostiki uporabljamo nekatere

standardne panele protiteles, ki so komercialno dostopna in so označena v skladu z mednarodno CD klasifikacijo.

Poleg opredelitve tipa malignega limfoma nam morfološke preiskave v najširšem smislu (patohistološka in citopatološka analiza), imunofenotipizacija (z imunocitokemijo, imunohistologijo, pretočno citometrijo) in molekularne metode omogočajo še:

- razlikovanje med neoplastičnimi (malignimi limfomi) in reaktivnimi limfoproliferativnimi lezijami (psevdolinfomi),
- oceno razširjenosti (stadija) bolezni (predvsem s preiskavo kostnega mozga),
- določanje prognostičnih dejavnikov, ki so pomembni za načrtovanje zdravljenja ter
- sledenje bolezni (follow up) s potrditvijo remisije po zdravljenju in ugotavljanje recidivov oz. detekcijo minimalne rezidualne bolezni (MRD).

c. Citogenetske analize:

V diagnostiki malignih limfomov je poleg naštetih preiskav cito in histologije ključna citogenetska analiza, ki je pomemben pripomoček pri diagnosticiranju NHL, saj so določene kromosomske nepravilnosti značilne za določene vrste limfomov. Nekatere citogenetske nepravilnosti lahko odkrijemo s konvencionalnim kariotipom ali s fluorescenčno in situ hibridizacijo (FISH). Najprimernejša tehnika je odvisna od kliničnega stanja, razpoložljivega tkiva in domnevne diagnoze.

d. Molekularno genetske analize:

Molekularno genetske analize imajo pomen pri potrditvi diagnoze, kot je to primer limfoplazmocitnega limfoma (MYD88) ali kot prognostičen pripomoček pri izbiri terapije in nadaljnji strategiji zdravljenja (KLL). Vključujejo testiranje mutacij (TP53, MYD88), genskih preureditev (IGHV), pridobitve ali izgube določenih genov in/ali epigenetskih sprememb. Uporabijo se lahko različne tehnike, vključno z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) ali sekvenciranjem deoksiribonukleinske kisline (DNK).

Slikovna diagnostika

Po zaključeni diagnozi, ki temelji na osnovi patohistoloških in molekularno genetskih preiskav, pri bolnikih z limfomom pred začetkom zdravljenja opravimo tako imenovane »zamejitvene« preiskave, s katerimi pridobimo informacije o razširjenosti limfoma po različnih organskih sistemih. Računalniško tomografska preiskava (CT) vratu (in obnosnih votlin), prsnega koša in trebuha z medenico s kontrastnim sredstvom je preiskava izbora za limfome, ki ne kopičijo fluorodeoksiglukoze. To so predvsem; kronična limfatična levkemija (KLL) in drugi drobnocelični limfocitni limfom, limfomi marginalne cone, limfoplazmacitni limfom, fungoidna mikoza. Glede na klinično situacijo lahko opravimo tudi manj natančne preiskave, npr. pri kronični limfocitni levkemiji ob prvi prezentaciji bolezni pogostokrat zadostuje le rentgenogram prsnih organov v dveh projekcijah in ultrazvočna preiskava trebuha.

Pozitronska emisijska tomografija kombinirana z računalniško tomografsko preiskavo PET-CT) je preiskava izbora za Hodgkinove limfome in zrele limfome B in T, ki kopičijo fluorodeoksiglukozo. PET-CT slikanje je uporabno tako za določanje stadija, kot tudi za ocenjevanje odziva na zdravljenje limfoma in se na splošno priporoča kot del rutinskega določanja stadija bolezni in po končanem zdravljenju za oceno uspešnosti zdravljenja.

Zaključek

V klinični praksi sta pri sumu na limfocitno novotvorbo ključna anamneza in klinični pregled bolnika. Natančna diagnoza in sodobna klasifikacija malignih limfomov temelji na citomorfološkem pregledu prizadetega organa in histološki analizi z imunokemijskimi barvanji, preiskavi pretočne citometrije in molekularno genetskih analiz limfomskih celic.

Zaradi relativno lahke dostopnosti vzorcev kostnega mozga se v klinični praksi pogostokrat poslužujemo le preiskav, ki vključujejo pregled kostnega mozga, vendar moramo vedeti, da v primeru negativnega izvida preiskava v celoti ne izključuje limfocitne novotvorbe. Za natančno klasifikacijo je obvezna histološka preiskava celotne bezgavke oziroma tarčnega tkiva.

Literatura:

1. Barbara Jezeršek Novaković, Lučka Boltežar, Andrej Doma, Andreja Eberl, Gorana Gašljević, Biljana Grčar Kuzmanov in drugi; Priporočila za obravnavo bolnikov z malignimi limfomi;; Onkološki Inštitut Ljubljana; januar 2025
2. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®); Version 2.2025 — February 10, 2025
3. Silvia Montoto, Martin Dreyling, Veronika Ballova; Essentials for Clinicians Third Edition: Lymphomas: Essentials for Clinicians; Mach 2024
4. Arnold S Freedman and Jonathan W Friedberg; Clinical presentation and initial evaluation of non-Hodgkin lymphoma - UpToDate

Celični označevalci pri prekursorskih limfocitnih novotvorbah

Katarina Reberšek

Univerzitetni klinični center Ljubljana

katarina.rebersek@kclj.si

Uvod

Prekursorske limfatične novotvorbe nastanejo kot posledica rakavo spremenjene limfatične celice. Če infiltracija kostnega mozga z limfoblasti ne presega 25 odstotkov govorimo o limfoblastnem limfomu (LBL), sicer pa o akutni limfatični levkemiji (ALL). Na osnovi celičnih označevalcev ločimo B in T celično ALL/LBL.

Trenutna klasifikacija WHO je za limfatične novotvorbe sprejela dokaj konservativen pristop. Bolezni organizira po naraščajočem nivoju specifikacije, in sicer kot kategorijo (npr. zrel B-limfom), družino/razred (npr. velikocelični B limfom), entiteto/tip (npr. difuzni velikocelični B limfom, brez določene opredelitve) in podtip (npr. difuzni velikocelični B limfom, brez določene opredelitve, tipa GCB). WHO sicer priznava naraščajoči pomen genetskih sprememb, vendar so entitete in podtipi oblikovani tako, da je klasifikacija WHO mogoča globalno, tudi kjer diagnostične metode niso dostopne oziroma ko je kakovost ali količina materiala omejena, takrat se lahko uporabi diagnostična oznaka, ki temelji na družini entitete.

Za vsako entiteto so opredeljeni bistveni in želeni diagnostični kriteriji. Bistveni kriteriji so minimalni kriteriji, ki omogočajo diagnozo entitete na čim bolj univerzalni način, želeni kriteriji so tisti, ki pomagajo pri dodatni opredelitvi diagnoze in običajno zahtevajo uporabo naprednih tehnik.

Na osnovi bistvenih in želenih diagnostičnih kriterijev se lahko ALL/LBL diagnosticira zgolj na podlagi morfologije in imunofenotipa na ravni družine/razreda kot ALL/LBL, ne dalje klasificirano (»not further classified«-NFC). Večina entitet se lahko klasificira na podlagi obsežnega genetskega testiranja in entiteta ALL, brez določene opredelitve (»not otherwise specified«-NOS) se uporablja v primerih, ki jih ni mogoče klasificirati niti po obsežnem genetskem testiranju.

B limfoblastna levkemija/limfom

Za B ALL/LBL so značilni celični imunološki označevalci CD19, CD22 in CD79a. Na celični membrani oziroma v citoplazmi limfoblastov morata biti hkrati prisotna vsaj dva od naštetih celičnih označevalcev. Nobeden od posamičnih označevalcev ni sam po sebi specifičen. B ALL razdelimo po stopnji diferenciacije blastnih celic na naslednje imunološke podtipe: pro B ALL, ki nima dodatnih celičnih označevalcev, občo B ALL, ki jo določa membranski CD10 označevalec in pre B ALL, kjer poleg CD10 na membrani določimo še IgM v citoplazmi limfoblastov. Burkittov limfom, prej imunološko poznan kot zrela B ALL, označujejo membranski CD10 in IgM, v citoplazmi ali na celični membrani hkrati še lahke verige kappa ali lambda. Najpogostejši podtip znotraj B ALL je obča oblika, ki je prisotna pri 40 % bolnikov.

T limfoblastna levkemija/limfom

Za T ALL/LBL sta značilna označevalca CD7 na membrani in CD3 v citoplazmi, ki je tudi specifičen za T celično linijo. Pogosto je pozitiven TdT, lahko pa so izraženi CD1a, CD2, CD4, CD5 in CD8. T ALL razdelimo po stopnji diferenciacije blastnih celic na naslednje imunološke podtipe: če limfoblasti nimajo dodatnih označevalcev, kot sta citoplazemski CD3 in CD7, gre za pro T ALL. Če sta prisotna še CD2 in/ali CD5, gre za pre T ALL, če je izražen CD1a, gre za kortikalno T ALL in za zrelo T ALL, če je na celični površini, ne v citoplazmi, CD3 označevalec. Če je na limfoblastih prisoten en ali več označevalcev zgodnje hematopoeze (CD34, HLA-DR) oziroma so prisotni označevalci mieloične linije (CD13, CD33) gre za »early T cell precursor« (ETP)-ALL, značilno je odsoten CD8 in CD1a, CD5 je odsoten ali prisoten v manj kot 75% blastov. Najpogostejša podtipa sta pre T in kortikalna T ALL. Nasploh je T ALL pogostejša pri odraslih kot pri otrocih.

ALL/LBL ima lahko na celični površini oziroma v citoplazmi limfoblastov poleg imunoloških označevalcev za limfatično vrsto še označevalce, značilne za mieloično celično linijo oziroma limfatične označevalce, ki pripadajo drugi celični liniji. Vendar redko sočasno izražanje limfatičnih oziroma mieloičnih antigenov označuje akutno levkemijo mešanega fenotipa (»mixed phenotype acute leukemia«-MPAL), vendar pa tako imenovano aberantno izražanje omogoča sledenje

minimalnemu preostanku bolezni (»minimal residual disease«-MRD). Dodatni označevalci na limfoblastih nam pomagajo pri prepoznavi posameznih genetskih podskupin.

Akutna levkemija nejasne vrste

Če ni mogoče opredeliti levkemičnih celic kot mieloične ali limfatične, gre za akutno levkemijo nejasne celične vrste. Ključna preiskava pri teh levkemijah je imunofenotipizacija levkemičnih celic. Akutno levkemijo nejasne vrste delimo na nediferencirane akutne levkemije in MPAL. Za nediferencirane akutne levkemije je značilna odsotnost kakršnihkoli specifičnih antigenov. Pri MPAL imajo blastne celice antigene več celičnih vrst (mešani fenotip). Ob tem je lahko prisotnih več populacij blastnih celic z različnim imunofenotipom, ali pa je prisotna ena sama populacija blastov, ki ima sočasno izraženih več antigenov in izpolnjuje kriterije za različne celične vrste.

Dodelitev celične linije z imunofenotipizacijo je odvisna od moči povezave med vsakim antigenom in celično linijo. Kot splošen princip velja, da bolj ko je izražanje antigena podobno intenziteti in/ali vzorcu izražanja, ki ga zaznamo pri normalni populaciji, večja je verjetnost, da pripada tej celični liniji. Izražanje mieloperoksidaze v blastih, kjer je intenziteta in vzorec podoben tistemu, ki ga opazimo pri zgodnjih razvojnih stopnjah mieloične vrste, je bolj povezano z mieloično linijo kot homogeno šibko izražanje. Določitev izražanja mieloperoksidaze s citokemijo in/ali imunofenotipizacijo s pretočno citometrijo igra predvsem ključno vlogo v diferencialni diagnozi AML z minimalno diferenciacijo, T/mieloična MPAL in ETP-ALL. Poleg tega sočasno izražanje več antigenov iste linije še dodatno izboljša specifičnost teh antigenov za določitev linije, npr. sočasno izražanje CD19, CD22 in CD10 je bolj povezano z B linijo kot vsak posamičen antigen. Na tej osnovi so bili v WHO klasifikaciji prenovljeni imunofenotipski kriteriji za dodelitev celične linije v primerih, kjer ena linija ni očitna.

Literatura

1. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBO, Berti E et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1720-48.

2. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, Quintanilla-Martinez L, Swerdlow SH, Anderson KC et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood*. 2022;140(11):1229–53.
3. Falini B, Martino G, Lazzi S. A comparison of the International Consensus and 5th World Health Organization classifications of mature B-cell lymphomas. *Leukemia*. 2023;37:18–34.
4. 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):1703-19.

Celični označevalci pri novotvorbah zrelih B celic

Tadej Furlan

Univerzitetni klinični center Ljubljana

tadej.furlan@kclj.si

Število bolnikov z malignimi limfomi zadnja leta strmo narašča. Pri teh bolnikih se limfomi pogosto pojavljajo kot adenopatija (tumorska masa, ki vključuje različne organe), ali kot levkemija. Morfološko in klinično velikokrat težko ločimo med benigno in maligno obliko bolezni. Posledično je lahko diagnoza precej težavna. Zaradi tega se pri diagnostiki limfomov poslužujemo tudi kompleksnejših diagnostičnih metod, kot so pretočna citometrija in molekularne tehnike. V zadnjih 10 letih so bili doseženi številni napredki v tehnologiji pretočnih citometrov in razpoložljivosti širokega nabora protiteles in fluorokromov. Vse to je izboljšalo našo sposobnost prepoznavanja normalnih celičnih populacij in prepoznavanja celic s specifičnimi fenotipskimi nepravilnostmi, tudi kadar so prisotne v majhnem deležu analiziranih celic. Začetek 21. stoletja je prav tako prineslo izboljšanje meril, ki se uporabljajo za prepoznavanje različnih bolezenskih entitet, s širokim sprejetjem klasifikacije Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) iz leta 2001. Ta klasifikacija podpira multiparametrični pristop k diagnozi in opisuje morfološke, imunofenotipske in genetske značilnosti, ki so značilne za vsako bolezensko entiteto.

Imunofenotipizacija malignih limfomov je pomemben diagnostični postopek, ki se uporablja za identifikacijo specifičnih celic, vključenih v limfomske neoplazije, ter za razvrščanje limfomov glede na vrsto celic, ki jih sestavljajo. Ta metoda temelji na analizi celic v vzorcu (npr. kri, likvor, kostni mozeg,...) z uporabo protiteles, označenih s fluorokromi, ki prepoznajo specifične antigene na površini celic. Imunofenotipizacija omogoča določitev vrste celic (B-, T- ali NK-linija) in njihovih specifičnih značilnosti, kar je ključno za pravilno diagnozo in klasifikacijo limfoma.

Vloga imunofenotipizacije pri diagnozi limfomov:

1. Razločevanje med benignimi in malignimi limfomi: preiskava omogoča razlikovanje med normalnimi reaktivnimi celicami in malignimi limfomskimi celicami, ki imajo specifične fenotipske lastnosti.
2. Razvrstitev limfomov: Na podlagi imunofenotipizacije lahko limfome razvrstimo v različne skupine, kot so B-celični, T-celični ali NK-celični limfomi. B-celični limfomi predstavljajo največji del limfomov in vključujejo različne podtipе, kot so kronična limfocitna levkemija, limfom plaščnih celic, folikularni limfomi, difuzni veliki B-celični limfomi, in drugi. T-celični limfomi pa so manj pogosti, vendar predstavljajo pomembno skupino limfomov.
3. Prepoznavanje specifičnih antigenov: Za vsako vrsto limfoma so značilni specifični antigeni, ki jih je mogoče prepoznati z uporabo imunofenotipskih metod.
4. Določanje klonalnosti: Pri malignih limfomih pogosto pride do klonalne proliferacije celic, ki izražajo samo en tip imunoglobulinske lahke verige (kappa ali lambda) ali specifične T-celične antigene. Ta klonalnost je pomemben diagnostični znak malignosti.

Sledenje minimalni preostali bolezni (MRD)

Imunofenotipizacija je koristna tudi pri sledenju minimalne preostale bolezni po zdravljenju, saj omogoča odkrivanje manjših populacij malignih celic, ki so še vedno prisotne v telesu, a niso dovolj številčne za zaznavanje z drugimi metodami, kot je citologija ali histologija. Pri določanju minimalne preostale bolezni moramo analizirati vsaj 500.000 celic, idealno pa vsaj 1.000.000 celic. Na ta način lahko zaznamo 1 limfomsko celico na 10.000 normalnih (10^{-4}). Težava pri določanju MRD je, da se vzorec kostnega mozga ali periferne krvi analizira po zdravljenju. Zato izoliramo zelo majhno število celic, posledično pa težko dosežemo cilj 1.000.000 analiziranih celic. Pri sami metodi določanja MRD je potrebno določiti tudi mejo zaznavnosti in mejo kvantifikacije.

Specifične značilnosti imunofenotipizacije malignih limfomov

B-celični limfomi pogosto izražajo specifične antigene kot so npr. CD19, CD20, CD22 in CD79b, ki so prisotni na površini zrelih limfocitov B. Vendar pa se lahko pri malignih B-celičnih limfomih

opazi nenormalno izražanje imunoglobulinskih lahkih verig ter nenormalno izražanje ali odsotnost različnih antigenov.

Pomen interpretacije rezultatov

Rezultati imunofenotipizacije niso vedno enoznačni in jih je potrebno interpretirati v kontekstu kliničnih, morfoloških in drugih laboratorijskih rezultatov. Imunofenotipizacija je ključni del sodobne diagnostike limfomov, saj omogoča natančno identifikacijo vrste limfoma, prepoznavanje klonalnosti in pomoč pri odločanju o nadaljnjih diagnostičnih in terapevtskih korakih.

Literatura

1. Bottcher et al. Expert-independent classification of mature B-cell neoplasms using standardized flow cytometry: a multicentric study. *Blood Adv.* 2022;6(3):976-992.
2. Craig F.E., Foon K.A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood.* 2008;111(8):3941-67.

Pomen genetskih preiskav v diagnostiki limfocitnih novotvorb

Helena Podgornik

Univerzitetni klinični center Ljubljana

helena.podgornik@kclj.si

Klasifikacija svetovne zdravstvene organizacije (WHO) novotvorbe v limfocitni vrsti ločuje glede na zrelost maligno spremenjene celice, in sicer na novotvorbe prekursorjskih (akutne limfoblastne levkemije – ALL) in zrelih celic, znotraj teh dveh skupin pa še glede na linijo, T in B. Genetske spremembe so pomemben del klasifikacije pri novotvorbah prekursorjskih celic B, v zadnji razvrstitvi so dobile pomembnejšo vlogo tudi pri novotvorbah zrelih celic B, pri T celični vrsti pa je njihova vloga še vedno manjša.

Limfatične novotvorbe prekursorjskih celic – akutne limfoblastne levkemije

Razvrščanje podvrst B-celične limfoblastne levkemije (B-ALL) temelji že od leta 2008 tudi na genetskih spremembah. Že tedaj sta bili prepoznani podskupini s spremembah ploidnosti kariotipa (hiperdiploidnost, hipodiploidnost) ter pogostejše ponavljajoče spremembe oziroma spremembe, povezane z značilnim fenotipom ter potekom bolezni: fuzijski geni *BCR::ABL1*, *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1* in *IGH::IL3* ter preureditve gena *KMT2A*. Leta 2016 se tem skupinam pridruži še *iAMP21* (intrakromosomska amplifikacija kromosoma 21) ter B-ALL z *BCR::ABL1* podobnimi lastnostmi kot začasna entiteta. V zadnji klasifikaciji iz leta 2022 pa ostanejo vse prej naštetе skupine vključno z *BCR::ABL1* podobnimi lastnostmi, pridružijo se jim še sicer redka *TCF3::HLF* ter B-ALL z *ETV6::RUNX1* podobnimi lastnostmi. Tako kot pri akutni mieloblastni levkemiji smo dobili tudi pri B-ALL bolj ohlapno definirano skupino z drugimi genetskimi spremembami, kamor sodijo preureditve genov *DUX4*, *MEF2D*, *ZNF384* in *NUTM1*, fuzija genov *IGH::MYC* in spremembe *PAX5alt* ali *PAX5 p.P80R*.

Genetske preiskave so torej pri B-ALL tako zaradi klasifikacijskega kot prognostičnega pomena obvezne. Zaradi velike raznovrstnosti in specifičnih lastnosti sprememb je standardno analizo proganih kromosomov potrebno nadgrajevati s preiskavo FISH, sekvenciranjem RNA in DNA,

primerjalno genomsko hibridizacijo (CGH) ter optičnim genomskim mapiranjem (OGM). Prav pri B-ALL se ta nova tehnologija najbolj uveljavlja (2). Pri pripravi diagnostičnih algoritmov so zelo pomembni podatki pretočne citometrije. Ne le zaradi ločevanja podvrst glede na linijo, pač pa tudi zaradi prepoznavanja akutne levkemije mešanega fenotipa (MPAL) ter posameznih genetskih podskupin, ki jih označuje specifično izražanje označevalcev. *ETV6::RUNX1* podobno B-ALL prepoznamo le preko specifičnega imunofenotipa CD19+CD27+CD44-/dim, sicer pa s specifično gensko ekspresijo, ki je redko del rutinske diagnostične obravnave. Ph-podobno B-ALL s preureditvijo gena *CRLF2* prepoznamo lahko že prekomernega izražanja tega receptorja, preureditev pa kasneje potrjujemo s preiskavo FISH. Koekspresija CD371 in CD2 kaže na DUX4-preurejeno (-r) B-ALL. Šibko ali negativno izražanje CD10 je značilno za KMT2A-r, ZNF384-r in MEF2D-r (3). Vsaka B-ALL z negativnim CD34 pa zahteva preverjanje preureditev, značilnih za novotvorbe zrelih limfocitov B. B-ALL s preureditvami genov *ZNF384*, *DUX4* ali *PAX5* p.P80R kažejo po zdravljenju, ali že ob diagnozi, monocitno diferenciacijo.

Smiselno je torej, da vse informacije, pridobljene s pretočno citometrijo in citomorfološkim pregledom upoštevamo pred začetkom genetskega testiranja, ker to prihrani čas in denar. Diagnostični pristop mora biti namreč sistematičen in racionalen, upoštevati je potrebno razpoložljive metode in njihovo smiselno kombiniranje, da do rezultata pridemo v čim hitrejšem času, obenem pa ne izpustimo katere od sprememb.

Čeprav genetske spremembe najdemo tudi pri 50-70% bolnikov s T-ALL, klasifikacija WHO ni prepoznala nobene genetske spremembe, ki bi klasificirala podvrsto T-ALL (1). Razvrstitev ICC pa vključuje 8 začasnih genetskih entitet T-ALL: *HOXA*, *SPI1*, *TLX1*, *TLX3*, *NKX2*, *TAL1/TAL2* in *LMO1/LMO2* (4). V ozadju povečanega izražanja gre največkrat za različne translokacije.

Pri T-ALL je tako kot pri B-ALL kariotipizacija izhodiščna preiskava, ki jo obvezno dopolnjuje preiskava FISH, nadgrajujejo pa druge metode. Pri vseh ALL moramo preverjati preureditev gena *KMT2A* ter fuzijski gen *BCR::ABL1*. Pri B-ALL zaradi pogostosti te fuzije, pri T-ALL pa za izključevanje fuzije in prepoznavanje drugih preureditev, ki vključujejo *ABL1* (5). Nato pri preureditvah, ki smo jih prepoznali v kariotipu, te potrjujemo s preiskavo FISH, pri slabi morfologiji kromosomov ali pri normalnem kariotipu pa vselej analiziramo gene *TCR*, *TLX1*, *TLX3ter* *PICALM::MLLT10*. Ob

negativnih rezultatih nadaljujemo z naborom ostalih genov začasnih skupin. Tabela 1 povzema ponavljajoče spremembe, ki določajo podvrste ALL.

Limfatične novotvorbe zrelih celic

Že od začetka tega tisočletja so genetske preiskave del rutinske obravnave pri kronični limfatični levkemiji, kjer pa nimajo diagnostičnega pomena, pač pa prognostični. Tudi sicer lahko rečemo, da imajo genetske preiskave pri novotvorbah zrelih celic limfatične vrste prvenstveno diferencialno diagnostični pomen in da je njihove izsledke nujno potrebno vrednotiti skupaj z izsledki pretočne citometrije, histopatologije ter klinične slike. Ključni razlog je v tem, da se iste genetske spremembe pojavljajo pri več podvrstah bolezni, zato niso diagnostično specifične.

Kljub temu, da je zelo malo podvrst teh bolezni, ki so klasificirane neposredno na prisotnih genetskih spremembah, pa imamo kar nekaj takih, kjer so genetski označevalci ključni za dokončno postavitve diagnoze. Takšni sta mutacija v genu *BRAF* p.V600E, ki jo najdemo pri >95% bolnikov z dlakastocelično levkemijo ter mutacija v genu *MYD88* p.L265P, ki jo najdemo pri >90% bolnikov z limfoplazmocitnim limfomom. Pri slednjih pogosto (~40%) najdemo ob *MYD88* še mutacijo v genu *CXCR4*, ki kaže na agresivnejši potek in slabšo odzivnost na zdravljenje z inhibitorji Brutonove kinaze. Več kot 95% bolnikov z limfomom plaščnih celic ima translokacijo t(11;14)(q13;q32), ki vodi v tvorbo fuzijskega gena *IGH::CCND1*, zato je ta označevalec ključen pri potrditvi diagnoze. Pri klasičnem folikularnem limfomu je močan označevalec prisotnost translokacije t(14;18)(q32;q21) s fuzijskim genom *IGH::BCL2*, ki jo najdemo pri 85% bolnikov.

Izpostaviti velja vlogo genetskih preiskav pri ločevanju med B-ALL z negativnim CD34 ter agresivnimi limfomi, kjer je preverjanje prisotnosti preureditev genov *MYC*, *BCL2* ter *BCL6* oziroma fuzijskega gena *IGH::MYC* ključno za dokončno postavitve diagnoze. Preureditve v posameznih od navedenih genov ali njihovo sopojavljanje so ključne za razvrščanje difuznih velikoceličnih B limfom (DLBCL). Po WHO klasifikaciji (1) imamo namreč tri na teh genetskih spremembah temelječe skupine, in sicer DLBCL s preureditvijo *MYC* in *BCL2*, Burkittov limfom ter agresivni B-celični limfom s spremembami 11q. Med B-celičnimi limfomi sicer najdemo še eno skupino, ki je utemeljeni na genetskih spremembah, namreč DLBCL s preureditvami *IRF4*. DLBCL praviloma sicer

na KO za hematologijo ne diagnosticiramo in zdravimo, se pa občasno srečamo z levkemiziranimi oblikami bolezni, pri katerih so predvsem genetske preiskave ključne za natančno postavitev diagnoze.

Najmanjša je vloga genetskih preiskav pri zrelih T-celičnih novotvorbah. Izjeme najdemo pri T-celični levkemiji velikih granuliranih limfocitov (T-LGLL), kjer mutacije v genu *STAT3* povezujejo s slabšim preživetjem. Značilno pa se prisotnost mutacij povezuje s pozitivnim CD8.

Povzetek

Genetske preiskave nastopajo pri novotvorbah limfatične vrste v vseh svojih pomembnih vlogah: v klasifikacijski, napovedni, kot označevalci ostanka bolezni ter kot potencialne tarče zdravljenja. Vendar pa je njihova moč pri različnih podvrstah novotvorb zelo različna. Največja je pri B-ALL, nekoliko manjša pri novotvorbah zrelih celic B, pri T-celičnih novotvorbah pa najmanjša. Ključno je, da h genetski diagnostiki pristopamo sistematično ter upošteva je izsledke predhodnih preiskav.

Tabela 1: Na genetskih spremembah temelječe klasifikacijske skupine limfatičnih novotvorb prekurzorskih celic WHO ter IFCC

B-ALL/limfoblastni limfom (WHO ter ICC)	T-ALL/limfoblastni limfom (ICC, začasne entitete)
z visoko hiperdiploidnostjo	z deregulacijo HOXA
s hipodiploidnostjo	s preureditvami SPI1
z iAMP21	s prekomernim izražanjem TLX1
s fuzijo <i>BCR::ABL1</i>	s prekomernim izražanjem TLX3
z <i>BCR::ABL1</i> podobnimi lastnostmi	s preureditvami NKX2
z <i>ETV6::RUNX1</i> podobnimi lastnostmi	s prekomernim izražanjem TAL1/TAL2
s fuzijo <i>ETV6::RUNX1</i>	s prekomernim izražanjem LMO1/LMO2
s preureditvami gena <i>KMT2A</i>	
s fuzijo <i>TCF3::PBX1</i>	
s fuzijo <i>IGH::IL3</i>	
s fuzijo <i>TCF3::HLF</i>	
z drugimi genetskimi spremembami: <i>DUX4</i> , <i>MEF2D</i> , <i>ZNF384</i> , <i>NUTM1</i> , <i>IGH::MYC</i> , <i>PAX5alt/PAX5 p.P80R</i>	

Literatura:

1. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, et al. The 5th edition of the world health organization classification of haemato-lymphoid tumours: lymphoid neoplasms. *Leukemia* 2022;36(7):1720–48.
2. Tueur G, Quessada J, De Bie J, Cuccuini W, Toujani S, Lefebvre C, et al. Cytogenetics in the management of B-cell acute lymphoblastic leukemia: Guidelines from the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH). *Curr Res Transl Med*. 2023;71(4):103434.
3. Duffield AS, Mullighan CG, Borowitz MJ. International Consensus Classification of acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Virchows Arch*. 2023;482(1):11-26.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International consensus classification of myeloid neoplasms and acute leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* 2022;140(11): 1200–28.
5. De Bie J, Quessada J, Tueur G, Lefebvre C, Luquet I, et al. Cytogenetics in the management of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): Guidelines from the Groupe Francophone de Cytogenetique Hematologique (GFCH). *Curr Res Transl Med*. 2023 Oct-Dec;71(4):103431.

Izzivi pri mobilizaciji in zbiranju krvotvornih matičnih celic (ZHS, HLZ, ZTMS)

Učinkovitost pleriksaforja pri mobilizaciji krvotvornih matičnih celic

Čemažar Luka¹, Poženel Primož²

1 Univerzitetni klinični center Ljubljana, 2 Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino
luka.cemazar@kclj.si

Uvod

Pleriksafor je selektivni reverzibilni antagonist receptorja CXCR4, ki blokira vezavo z ligandom (SDF-1 α), kar pripelje do sproščanja krvotvornih matičnih celic (KMC) v periferno kri. Ta mehanizem izkoriščamo pri t.i. slabih mobilizatorjih, pri katerih z G-CSF ne zberemo dovolj KMC za varno presaditev KMC (PKMC) ali pa pri tistih, pri katerih že vnaprej pričakujemo zahtevnejše zbiranje. Prvi način (»on demand«) pomeni uporabo glede na število CD34+ celic pred postopkom afereze. V nekaterih centrih je meja za uporabo pleriksaforja postavljena pri koncentraciji celic CD34+ <20 $\times 10^6$ /L po štirih dneh prejemanja G-CSF, oziroma ga uporabijo pri tistih bolnikih, ki s prvo aferezo zberejo <1 $\times 10^6$ CD34+/kg. Drugi način (»upfront«) je rezerviran za bolnike, pri katerih se predvideva slabšo mobilizacijo, zato prejmejo pleriksafor že pred prvo aferezo.

Pri bolnikih z DP v zadnjih letih narašča uporaba lenalidomida in daratumumaba, kar vpliva na pogostejšo uporabo pleriksaforja za mobilizacijo KMC. To potrjujejo tudi izsledki študije GRIFFIN, kjer je pleriksafor prejelo 72 % bolnikov v skupini z D-VRD in 55 % bolnikov v skupini, ki je prejela VRD. Povprečno število zbranih celic v skupini, ki je prejela indukcijsko terapijo z D-VRD, je bilo 8,3 $\times 10^6$ /kg, v skupini z VRD pa 9,4 $\times 10^6$ /kg. Zahtevano minimalno število celic, potrebnih za avtologno PKMC (aPKMC), je že v prvem poskusu zbiranja doseglo 93,7 % bolnikov v skupini D-VRD in 98,8 % bolnikov v skupini VRD.

Glede na priporočila poskušamo pri bolnikih z DP v Sloveniji za eno aPKMC zbrati vsaj 3×10^6 celic CD34+/kg. Retrospektivna študija iz leta 2024 je ugotovila, da je bilo celokupno preživetje bolnikov z DP po aPKMC daljše, če je bil odmerek celic višji od 2.5×10^6 /kg.

Za mobilizacijo KMC uporabljamo različne strategije:

- G-CSF,
- G-CSF in pleriksafor ,
- kemoterapijo in G-CSF,
- kemoterapijo, G-CSF in pleriksafor.

Neuspešna mobilizacija, ki jo definiramo kot zbrano število CD34+ celic $< 2 \times 10^6$ /kg CD34 in se po G-CSF z ali brez kemoterapije, pojavi pri 6-23 % bolnikov. Dejavniki, ki vplivajo na slabšo mobilizacijo pri bolnikih z DP, so;

- > 3 krogi predhodnega zdravljenja z lenalidomidom, uporaba daratumumaba,
- začetna infiltracija kostnega mozga z več kot 60 % plazmatk
- citopenije pred zbiranjem

Izkušnje UKC LJ ter ZTM

Med januarjem 2022 in februarjem 2025 smo pri bolnikih z DP pleriksafor uporabili v 86 primerih. Skupno to predstavlja 39 % bolnikov (86/222), pri katerih smo v opazovanem obdobju zbirali KMC za aPKMC. Mediana starost je bila 60 let (33-70), moških je bilo 57 %. Pri 10/86 bolnikov smo mobilizirali KMC s ciklofosfamidom. Le pri enem bolniku smo po prvi aferezi zaradi akutnega poslabšanja kroničnih obolenj odstopili od nadaljnjega zbiranja.

Večina bolnikov je v indukcijskem zdravljenju prejela kombinacijo zdravil, ki je vsebovala lenalidomid (67%), daratumumab pa je prejelo 42 % bolnikov. Najpogosteje so bili zdravljeni po shemi VRD (44 %) ter DVRD (26 %), redke pa po shemi VCD, DVD, DVCD. Zaradi stranskih učinkov ali slabšega začetnega odgovora je 16 bolnikov prejelo kombinacijo dveh različnih shem zdravljenja. Mediana števila prejetih krogov pred mobilizacijo je bila 4 (3-6). Celokupni odgovor

na zdravljenje (ORR) smo zabeležili pri 90% bolnikov, od tega je 52% bolnikov doseglo $\geq$ VGPR (zelo dober delni odgovor).

Mediana časa od zaključka zdravljenja do prejetja pleriksaforja je bila 26 dni (8-105). V 63 primerih smo pleriksafor aplicirali zvečer na prvi dan meritve (»on-demand«), v 22 -ih pa na drugi dan. Pri večini je bil prvi dan meritve KMC na 4. dan prejemanja GCSF. V večini primerov (87%) koncentracija KMC na prvi dan meritve (na G-CSF) ni presegla želene vrednosti $>20 \times 10^6/L$. Mediana afereznih dni je bila 2 (1/3 bolnikov je potrebovala $\geq$ aferezne dni). V tabeli 1 so opisane karakteristike pripravkov KMC glede na indukcijsko zdravljenje in način mobilizacije.

Tabela 1

Prejeli Daratumumab:		NE: 50 (58.1)	DA: 36 (41.9)	Vsi: 86	p
Skupno št. CD 34+ $10^6/kg$	Median (IQR)	7.2 (5.4-9.7)	5.7 (4.4-6.8)	6.7 (5.1-8.6)	0.001
Delež CD34+ [%] v periferni krvi pred zibranjem	Median (IQR)	0.1 (0.1- 0.2)	0.1 (0.1 -0.1)	0.1 (0.1 - 0.1)	0.003
Delež CD34+ [%] v koncentratu	Median (IQR)	0.4 (0.3-0.6)	0.3 (0.2 - 0.4)	0.4 (0.3 - 0.6)	0.002
Koncentracija CD34+ [$10^6/L$] po GCSF- v periferni krvi	Median (IQR)	11.2 (7.1 - 14.2)	8.4 (5.0 - 12.5)	10.3 (6.4 -13.9)	0.056
Koncentracija CD34+ [$10^6/L$] v periferni krvi po plerixaforju	Median (IQR)	47.3 (32.4 - 70.1)	35.8 (25.2 - 50.4)	42.4 (29.757.8)	0.013
Razlika v konc. CD34+ [$10^6/L$] P-G v periferni krvi	Median (IQR)	35.5 (21.8 - 54.6)	27.8 (11.8-39)	31.0 (18.8 - 46.6)	0.043
št. CD 34+ $10^6/kg$ po GCSF (G)	Median (IQR)	1.8 (1.4 - 2.2)	1.6 (1.2 - 1.9)	1.7 (1.3 - 2.0)	0.214
št. CD 34+ $10^6/kg$ po pleriksaforju (P)	Median (IQR)	4.5 (3.3 - 7.1)	3.3 (2.2 - 4.0)	3.9 (2.6 - 5.7)	<0.001
Razlika št. CD 34+ $10^6/kg$ P-G	Median (IQR)	2.9 (2.0 - 5.0)	2.4 (1.5 - 2.9)	2.8 (1.6 - 4.2)	0.179

Zaključek

Kljub porastu uporabe kombinacije štirih zdravil, t.i. »quadruplet therapy«, pri zdravljenju DP z uporabo pleriksaforja zberemo dovolj KMC za varno aPKMC. Očitno povečanje koncentracije CD34+ celic po aplikaciji pleriksaforja potrjuje njegovo učinkovitost. Tisti bolniki, pri katerih smo opravili aferezo po stimulaciji z G-CSF, so v povprečju zbrali $1.7 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+, po pleriksaforju pa $3.9 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ celic (razlika 2.8)

Pri kohorti bolnikov, ki so prejeli kombinacijo zdravil brez daratumumaba, je bila mediana zbranih KMC $7.2 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ celic (2.8-13.6), v primerjavi s $5.7 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ celic (1.1-9.2) pri tistih ga prejeli. Ob tem ugotavljamo statistično pomembno razliko v deležu bolnikov, ki so zbrali $\geq 6 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ v prid tistih, ki daratumumaba niso prejeli (χ^2 test $p=0.025$).

Literatura

1. Mina R, Petrucci MT, Bonello F, et al. A prospective, multicenter study on hematopoietic stem-cell mobilization with cyclophosphamide plus granulocyte colony-stimulating factor and 'on-demand' plerixafor in multiple myeloma patients treated with novel agents. *Haematologica*. 2023 Nov 16;109(5):1525–34.
2. Hopman RK, DiPersio JF. Advances in Stem Cell Mobilization. *Blood Rev*. 2014 Jan;28(1):31–40.
3. Plerixafor-for-stem-cell-mobilisation.pdf [Internet]. [cited 2025 Mar 22]. Available from: <https://www.england.nhs.uk/wp-content/uploads/2018/07/Plerixafor-for-stem-cell-mobilisation.pdf>
4. He X, Jiang D, Zhao L, et al. Predictive factors for peripheral blood stem cell mobilization in multiple myeloma in the era of novel therapies: A single-center experience. *Cancer Med*. 2024 Jun;13(11):e7356.
5. Morris C, Chabannon C, Masszi T et al.. Results from a multicenter, noninterventional registry study for multiple myeloma patients who received stem

- cell mobilization regimens with and without plerixafor. *Bone Marrow Transplant*. 2020;55(2):356–66.
6. Chhabra S, Callander N, et al. Stem Cell Mobilization Yields with Daratumumab- and Lenalidomide-Containing Quadruplet Induction Therapy in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Findings from the MASTER and GRIFFIN Trials. *Transplantation and Cellular Therapy*. 2023 Mar 1;29(3):174.e1-174.e10.
 7. Bilgin YM. Use of Plerixafor for Stem Cell Mobilization in the Setting of Autologous and Allogeneic Stem Cell Transplantations: An Update. *J Blood Med*. 2021 Jun 2;12:403–12.
 8. Pasvolsky O, Marcoux C, Milton DR, Tanner MR, Bashir Q, et al. Optimal infused CD34+ cell dose in multiple myeloma patients undergoing upfront autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cancer J*. Nature Publishing Group; 2024 Oct 31;14(1):1–8.

Izzivi afereznih postopkov zbiranja krvotvornih matičnih celic pri visokem številu levkocitov

Marko Cukjati

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

marko.cukjati@ztm.si

Uvod

Uspešnost afereznega postopka zbiranja krvotvornih matičnih celic je odvisna od koncentracije CD34+ celic v periferni krvi v času afereze, volumna predelane krvi in učinkovitosti zbiranja. Učinkovitost zbiranja se meri v odstotku celic, ki se med afereznim postopkom izločijo iz polne krvi med prehodom skozi aparat. Najpogosteje se pri izračunu učinkovitosti uporablja naslednja enačba:

$$CE2 = \frac{\text{CD34+ v produktu (x10e6)}}{(\text{CD34+ v periferni krvi pred zbiranjem} \times (\text{volumen predelane krvi (L)} - \text{volumen antikoagulant (L)}))}.$$

Na CE2 vplivajo številni dejavniki, kot so tip celičnega ločevalca, hitrost pretoka, prekinitve med aferezo in število levkocitov v periferni krvi. Pri visokem številu levkocitov v periferni krvi je učinkovitost zbiranja manjša, saj je dinamika ločevanja celic otežena, posledično pa je težje zagotoviti ciljno število celic za presaditev.

Pomemben delež pacientov, pri katerih izvajamo aferezne postopke zbiranja krvotvornih matičnih celic, ima v času zbiranja visoko število levkocitov v periferni krvi (več kot $40 \times 10^9/\text{L}$), pri tem pa je odstotek matičnih celic zelo nizek (manj kot 0,1 %).

Učinkovitost lahko v primerih visokih levkocitov optimiziramo z individualnimi nastavitvami celičnega ločevalca, ki vključujejo prilagajanje pretokov in parametrov zbiranja (volumen krvi na cikel, točka pretakanja, širina zajema).

Dinamika ločevanja celic v pretočni centrifugi afereznega aparata je odvisna od pretokov. Najboljše ločevanje lahko dosežemo v relativno ozkem razponu pretokov, izven tega območja pa

učinkovitost ločevanja hitro upada. Običajno izberemo največji pretok, ki še omogoča relativno dobro ločevanje, hkrati pa nam omogoča, da znotraj časovnega intervala, ki je praviloma 6 ur, predelamo čimvečji volumen krvi. V primerih, ko želimo optimizarati učinkovitost zbiranja, izberemo nekoliko nižje pretoke, ki pa pomenijo manjši volumen predelane krvi v časovnem intervalu oz. podaljšan čas afereze. Daljši aferezni postopki so povezani z večjim tveganjem neželenih učinkov, kot so citratna reakcija, in večjim volumnom končnega pripravka.

Dodatno lahko učinkovitost zbiranja povečamo s širšim zajemom celične plasti, kjer se nahajajo krvotvorne matične celice, kar pa neizogibno vodi v večji volumen afereznega pripravka in večjo kontaminacijo z eritrociti, trombociti in granulociti. Večja vsebnost granulocitov in trombocitov v pripravku povzroča večje tvorjenje agregatov, v katere se ujamejo tudi matične celice in zadržijo med infuzijo v filtru. Granulociti so tudi neposredno povezani s pojavnostjo neželenih učinkov ob infuziji.

Pripravki z večjim volumnom zahtevajo večje kapacitete kriobanke za shranjevanje. Zaradi večjega volumna krioprotektorja (DMSO) je večja verjetnost neželenih učinkov med infuzijo. Volumska redukcija pred zamrzovanjem je sicer možna, vendar se s tem poveča koncentracija celic v pripravku, hkrati se izgubam krvotvornih matičnih celic med takšnim postopkom ne moremo povsem izogniti.

Koncentracija celic v zamrznjenem pripravku vpliva na viabilnost CD34+ celic. Prav tako višja koncentracija levkocitov med shranjevanjem na sobni temperaturi ali v hladilniku negativno vpliva na preživetje matičnih celic. Zgornja varna koncentracija sicer ni jasno definirana, večina centrov pa uporablja mejo $400 \times 10^9/\text{L}$ v primeru zamrzovanja oz. $200 \times 10^9/\text{L}$ v primeru daljšega (>24ur) shranjevanja na +4 st.C.

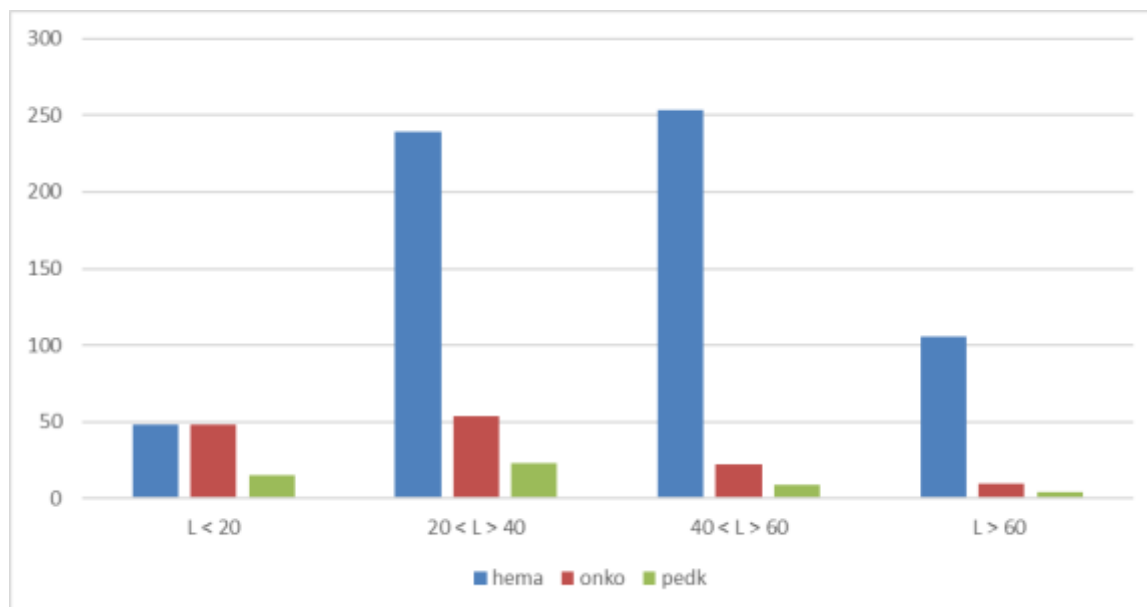
Podatki Centra za afereze (Zavod RS za transfuzijsko medicino)

V obdobju 2020-2024 smo opravili 831 avtolognih odvzemov PKMC z aferezo pri odraslih hematoloških, onkoloških in pediatričnih pacientih.

Koncentracija levkocitov v periferni krvi ob začetku afereze so bile v razponu od 2,74 do 157 x 10⁹/L (mediana 39,2). Koncentracija je bila večja od 40 x 10⁹/L pri 55,6 % hematoloških, 23,8 % onkoloških in 25,5 % pediatričnih afereznih postopkih. Z visokimi koncentracijami levkocitov se torej najpogosteje srečujemo pri hematoloških pacientih.

Paciente smo razdelili v štiri skupine glede na začetno koncentracijo levkocitov: prva skupina do 20, druga 20–40, tretja 40–60 in četrta več kot 60 x10⁹/L. Primerjali smo nekatere značilnosti aferezih postopkov med posameznimi skupinami.

Grafikon 1: Število aferez glede na začetno koncentracijo levkocitov (x10⁹) v periferni krvi po vrsti pacientov (hema - odrasli hematološki pacienti, onko – onkološki pacienti, pedk – pediatrični pacienti).



Število aferez, ki smo jih opravili po mobilizaciji s plerixaforjem, je bilo 120 (14,5 %). V prvi skupini je bil plerixafor uporabljen pri 7,1 %, v zadnji skupini pa kar pri 32,5 % vseh aferez. Večja koncentracija levkocitov je lahko povezana s samo aplikacijo plerixaforja, lahko pa je tudi posledica dejstva, da se za njegovo uporabo odločamo relativno pozno v postopku mobilizacije.

Volumen in koncentracija levkocitov v afereznem pripravku kaže trend naraščanja z večanjem začetne koncentracije v periferni krvi. Razlog je v prilagojenih nastavitvah afereznega odvzema, s

katerimi skušamo kompenzirati manjšo učinkovitost zbiranja pri večjih začetnih koncentracijah levkocitov (pogostejše praznjenje centrifuge, povečana širina zbiranja).

Tabela 1: Nekatere značilnosti afereznega odvzema glede na začetno koncentracijo levkocitov v periferni krvi. Podatki so predstavljeni kot mediana (Q1; Q3).

Levkociti pred aferezo (x10e9/L)	L < 20	20 < L > 40	40 < L > 60	L > 60
N	112	320	284	120
Plerixafor (%)	0,07	0,1	0,15	0,33
Volumen pripravka (mL)	196 (168; 229)	247 (216; 278)	273 (245; 302)	298 (268; 323)
Levkociti v pripravku (x10e9/L)	184,3 (149,2; 219,9)	235,2 (202,1; 266,9)	245,6 (213,4; 280,3)	265,2 (231,7; 291,1)
Učinkovitost zbiranja CE2 (%)	71,5 (60,9; 84,9)	61,7 (50,3; 75,1)	55,0 (43,0; 65,2)	47,2 (37,9; 57,4)

Zaključek

Visoke koncentracije levkocitov v periferni krvi so povezane s slabšo učinkovitostjo afereznega zbiranja krvotvornih matičnih celic, večjim volumnom in koncentracijo levkocitov v afereznem pripravku.

Medtem ko obstajajo različni pristopi za zmanjševanje tveganja neželenih učinkov zaradi večjega volumna krioprotektorja (DMSO) ob infuziji (volumska redukcija, nižja koncentracija DMSO, pranje po odmrzovanju), pa so možnosti nadzora neželenih učinkov zaradi večje količine levkocitov v pripravku zelo omejene. Dodatne izboljšave bi bilo smiselno iskati v protokolu mobilizacije (zgodnji uporabi plerixaforja).

Literatura

1. Boehlen R, Fernandez P, Bargetzi M, Sigle JP. A new protocol for improving efficiency of autologous peripheral blood stem cells collection in patients with high white blood cells counts. *J Clin Apher* 2020; 1-7.
2. Sakashita AM, Kondo AT, Yokoyama APH, et.al. The impact of preapheresis white blood cell count on autologous peripheral blood stem cell collection efficiency and HSC infusion side effect rate. *J Clin Apher* 2018; 33: 331-341.
3. Holbro A, Baldomero H, Lanza F, et.al. Handling, processing and disposal of stem cell products in Europe: A survey by the cellular therapy and immunobiology working party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Cytotherapy* 2018; 3: 453-60.
4. Hornberger K, Guanglin Yu, Hubel A. Cryopreservation of hematopoietic stem cells: emerging assays, cryoprotectant agents, and technology to improve outcomes. *Transfus Med Hemother* 2019; 46: 188-196.
5. Calmels B, Lemarie C, Esterni B, et.al. Occurrence and severity of adverse events after autologous hematopoietic progenitor cell infusion are related to the amount of granulocytes in the apheresis product. *Transfusion* 2007; 47(7): 1268-75.
6. The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies [Internet]. 8th edition. Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, et al., editors. Cham (CH): Springer; 2024.

Eritrocitoza pri krvodajalcih

Saša Anžej Doma¹, Polona Mali², Valentina Filipović Samec²

1 Univerzitetni klinični center Ljubljana, 2. Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

sasa.anzej.doma@kclj.si

Eritrocitoza je stanje povečane skupne mase eritrocitov, kar se odrazi na povišanem hemoglobinu (Hb) in hematokritu (Ht). Bolniki so lahko brez simptomov ali pa imajo simptome in znake povečane viskoznosti krvi. Eritrocitozo glede na izvor razdelimo na primarno, pri kateri je motnja v procesu eritropoeze, in sekundarno, pri kateri je motnja zunaj kostnega mozga. Obe sta lahko prirojeni ali pridobljeni. Najpogostejše je eritrocitoza sekundarna pridobljena; posledica številnih bolezni in stanj, ki jih spremlja hipoksemija (npr. bolezni srca in pljuč, kajenje, obstruktivna nočna apnea), tudi ledvična hipoksemija (pri stenozi ledvične arterije, policistični bolezni ledvic), ali neustrezno čezmerno ali avtonomno izločanje eritropoetina (npr. tumorji, ki izločajo eritropoetin). Možen vzrok eritrocitoze je tudi jemanje nekaterih zdravil (testosteron, eksogeni eritropoetin, zaviralci natrij-glukoze prenašalnega sistema). Edina primarna pridobljena eritrocitoza je policitemija vera, ki jo uvrščamo med mieloproliferativne novotvorbe; povezana je z genetskimi različicami *JAK2*. Primarne in sekundarne prirojene eritrocitoze pa so izjemno redke, posledica genetskih različic več genov.

Pri obravnavi bolnika z eritrocitozo uporabljamo diagnostični algoritem, pri katerem v prvem koraku izključujemo relativno eritrocitozo, pri kateri je skupna masa eritrocitov normalna, zmanjšana pa je prostornina plazme (npr. zaradi dehidracije). V drugem koraku hkrati izključujemo pravo policitemijo in iščemo sekundarne pridobljene vzroke eritrocitoze. Diagnosticiranje prave policitemije je ob ustrezni klinični sliki indicirano že pri vrednostih Hb > 165 g/L ali Ht > 0,49 za moške ter Hb > 160 g/L ali Ht > 0,48 za ženske. Bolezen enostavno potrdimo z določitvijo *JAK2* mutacije, ki je pozitivna v večini primerov, in eritropoetina, ki je znižan. Dodaten kriterij je najdba hipercelularnosti s panmielozo v biopsijskem stebričku kostnega mozga. Bolnike, ki ostajajo idiopatski kljub natančnim diagnostičnim preiskavam, lahko napotimo na genetsko testiranje za opredelitev prirojene eritrocitoze. Znanih je več kot 250 različic, povezanih z

razvojem prirojene eritrocitoze. Ta je verjetnejša pri pozitivni družinski anamnezi eritrocitoze in/ali pojavu eritrocitoze v mladosti. Odsotnost družinskih članov z eritrocitozo pa ne izključuje prirojenega vzroka, saj se lahko genetska različica pojavi de novo. Klinična slika bolnikov s prirojeno eritrocitozo je zelo raznovrstna, saj gre za mutacije v 9 različnih genih. Edina primarna prirojena eritrocitoza je družinska eritrocitoza tipa 1 (ECYT1) in je posledica genetskih različic v eritropoetskem receptorju (*EPOR*); karakterizira jo znižana raven eritropoetina. Sekundarne prirojene eritrocitoze tipa 2–8 (ECYT2–8) pa so posledica prirojenih genetskih različic genov *VHL*, *EGLN1*, *EPAS1* in *EPO*, ki so vključeni v zaznavanje ravni kisika v krvi, ter genov *HBB*, *HBA1*, *HBA2* in *BPGM*, ki vplivajo na afiniteto hemoglobina za kisik; pri vseh teh je raven eritropoetina normalna ali povišana.

Bolniki z družinsko eritrocitozo so lahko asimptomatski, lahko imajo le blage simptome, lahko pa povečano nagnjenost k trombozam, pri nekaterih oblikah je tudi pogosta najdba feokromocitomov in paragangliomov. Prevalenca dedne eritrocitoze ni znana, saj je opisana le pri redkih posameznikih. Kljub natančnemu preiskovanju in testiranju vseh znanih mutacij približno 70% bolnikov z eritrocitozo ostane etiološko neopredeljenih (idiopatska eritrocitoza). Bolniki s hemokromatozo imajo včasih tudi eritrocitozo in šele v zadnjem času ugotavljajo, da imajo bolniki z eritrocitozo tudi pogostejše mutacije v *HFE* genu, ki pa se jasno ne povezujejo s hemokromatozo. Priporočeno zdravljenje je odvisno od vzroka eritrocitoze; najpogostejše vključuje jemanje acetilsalicilne kisline in ustrezno zniževanje hematokrita z venepunkcijami, pri policitemiji veri pride v poštev tudi citoreduktivno zdravljenje. Medtem ko se pri slednji svetuje zniževanje Ht pod 0,45, je za prirojeno in idiopatsko eritrocitozo tarčni Ht višji, manj natančno določen oz. odvisen od predhodnih trombotičnih dogodkov. Podobno velja za acetilsalicilno kislino, ki jo predpisujemo v smislu primarne ali sekundarne preventive. Pri sekundarni eritrocitozi venepunkcije redko pridejo v poštev, saj je eritrocitoza običajno kompenzatorni mehanizem. Tudi pri hemokromatozi so indicirane venepunkcije z namenom preprečevanja prekomernega kopičenja železa.

V Sloveniji potrebujemo v povprečju okoli 300 do 350 krvodajalcev na dan, da bolnikom zagotovimo potrebno količino krvi. Krvodajalci so pomemben del zdravstvenega sistema, saj bolnikom omogočajo ustrezno zdravljenje s krvjo, transfuzijske službe so zadolžene za varovanje zdravja dajalca in prejemnika krvi. Kri lahko darujejo le krvodajalci, ki ustrezajo merilom za izbor/ darovanje krvi. Pred darovanjem krvi vsakemu krvodajalcu v kapilarni krvi določimo tudi orientacijsko koncentracijo Hb, kjer poleg spodnje meje, ki ne dovoljuje odvzema/ darovanja krvi (za moške pod 135 g/l, za ženske pod 125 g/l), lahko zdravniki ugotavljamo tudi vrednosti nad 180 g/l, kar zahteva dodatni posvet in nadaljnjo diagnostično obravnavo krvodajalca pri specialistu. Darovanje krvi je nezdržljivo s potrjeno policitemijo vero, medtem ko ostali sekundarni vzroki eritrocitoze, na podlagi ocene tveganja za takojšnje ali pozne posledice darovanja krvi odgovornega zdravnika, največkrat dovoljujejo darovanje/ odvzem krvi (npr. dehidracija, kajenje, zdravljenje apneje..).

Zaradi kompleksnosti različnih pogledov do vključevanja v krvodajalstvo bolnikov s hemokromatozo so ljudje s potrjeno hemokromatozo ponekod vključeni v krvodajalstvo pod določenimi posebnimi dodatnimi pogoji, ko je njihova bolezen v remisiji oz. raven koncentracije feritina v normalnih vrednostih, so brez posledic na tarčnih organih in ustrezajo vsem pogojem, kot veljajo za ostale krvodajalce.

Literatura:

1. Drnovšek E, Anžej Doma S, Kristan A, Debeljak N, Preložnik Zupan I. Obravnava bolnikov z neklonsko eritrocitozo. *Zdrav Vestn.* 2023;92(3–4):173–81
2. Gangat N, Szuber N, Tefferi A. *JAK2* unmutated erythrocytosis: 2023 Update on diagnosis and management. *Am J Hematol.* 2023; 98 (6): 965-981
3. Noumani I, Harrison CN, McMullin MF. Erythrocytosis: Diagnosis and investigation. *Int J Lab Hematol.* 2024 May;46 Suppl 1:55-62
4. Camps C, Petousi N, Bento C, Cario H, Copley RR, McMullin MF, et al. Gene panel sequencing improves the diagnostic work-up of patients with idiopathic erythrocytosis and identifies new mutations. *Haematologica.* 2016;101(11):1306-1318

5. Gašperšič J, Kristan A, Kunej T, Zupan IP, Debeljak N. Erythrocytosis: genes and pathways involved in disease development. *Blood Transfus.* 2021;19(6):518-532
6. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM). The Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Council of Europe 2020, 20 th ed.:14 <https://www.edqm.eu/en/>
7. Braseth TA, Hervig T, Rosvik AS. Hemochromatosis and blood donation. *Transfus Apher Sci.* 2017 Jun;56(3):485-489

Ukrepanje pri neodzivnosti na trombocitno plazmo

Karla Rener¹, Primož Rožman²

1 Univerzitetni klinični center Ljubljana, 2. Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino
karla.rener@ztm.si

Uvod - trombocitni pripravki

Trombocitni pripravki so krvne komponente, ki vsebujejo terapevtsko učinkovite trombocite. Ti so ponavadi suspendirani v mešanici plazme (35%) in ohranitvene raztopine (65%). Terapevtske enote trombocitov lahko pripravimo iz enot polne krvi, iz katerih pripravimo plazmo, bogato s trombociti (PRP metoda) ali buffy coat (BC metoda), nato pa zlijemo 5 (lahko od 4 –6) enot v en terapevtski odmerek. V enoti so tako združeni trombociti petih krvodajalcev, tako da vsebuje več kot 200×10^9 trombocitov. Drugi način priprave trombocitov je afereza, pri kateri odvezujemo cel terapevtski pripravek enemu samemu krvodajalcu s pomočjo afereznega ločevalca. Tudi v tem primeru je vsebnost trombocitov enaka. V obeh primerih dodamo trombocitom ohranitveno raztopino v zaprtem sistemu. Vse trombocitne pripravke pred tem tudi filtriramo (odstranimo levkocite). Trombocite shranjujemo pri 20 – 24 st. Celzija ob stalnem mešanju, da ne pride do strjevanja, uporabni pa so 5 dni (oz. 7 dni, če zagotovimo ustrezno bakterijsko kontrolo ali patogensko inaktivacijo). Pomembno je vedeti, da so trombociti tipizirani na krvne skupine ABO, RhD in Kell in se načeloma uporabljajo za bolnike na identičen ali vsaj skladen način.

Ker shranjujemo trombocitne komponente na sobni temperaturi, so zelo dovzetni za razrast morebitnih patogenih klic (virusi, bakterije, paraziti). To lahko preprečimo z inaktivacijo patogenov, ki jo lahko zagotovimo z obsevanjem, pranjem ali z zamrznjenjem. V praksi je najbolj uporabna inaktivacija patogenov s psoraleni (npr. 8-methoxypsoralen - 8-MOP, ali trimethyl-psoralen - TMP). Ti po osvetlitvi z UV svetlobo učinkovito inaktivirajo replikacijo patogenov in levkocitov, s čimer preprečijo sintezo citokinov v pripravku, bolezen GVHD (angl. graft versus host disease) pri prejemniku, zmanjšajo pa tudi pogostnost imunizacij HLA in febrilnih transfuzijskih reakcij.

Indikacije za transfuzijo trombocitov

Transfuzija trombocitov se izvaja za preprečevanje ali zdravljenje krvavitev pri bolnikih s trombocitopenijo ali disfunkcijo trombocitov. Indikacije lahko razdelimo na profilaktične (za preprečevanje krvavitev) in terapevtske (za zdravljenje obstoječih krvavitev).

Profilaktično transfuzijo trombocitov priporočajo pri bolnikih z nizkim številom trombocitov, tudi če trenutno ne krvavijo, da bi preprečili hude krvavitve. V to skupino sodijo hematološki bolniki, ki se zdravijo zaradi levkemij, aplastične anemije, s kemoterapijo ali so po presaditvi krvotvornih matičnih celic. Trombocite prejmejo stabilni bolniki, če je njihovo število trombocitov manjše od $10 \times 10^9/L$; ali če je št. trombocitov manjše od $20 \times 10^9/L$ in je prisotno tveganje za krvavitev, npr. povišana telesna temperatura. Pred invazivnimi posegi nadomeščamo trombocite glede na tveganje za krvavitev - pred manjšimi posegi (biopsije, lumbalna punkcija) zagotovimo število $>50 \times 10^9/L$; pred večjimi operativnimi posegi pa vsaj več kot $80-100 \times 10^9/L$.

Terapevtska transfuzija trombocitov je potrebna pri bolnikih, ki že krvavijo ali imajo povečano tveganje za krvavitev, to je:

- pri aktivni krvavitvi ob trombocitopeniji $<30-50 \times 10^9/L$
- pri masivni transfuziji ali ob diseminirani intravaskularni koagulaciji (DIK)
- pri bolnikih s hudimi okvarami delovanja trombocitov (npr. Glanzmannova trombastenija), kot tudi pri z zdravili povzročenih motnjah v delovanja trombocitov.
- izjemoma transfundiramo trombocite tudi bolnikom z imunsko trombocitopenijo (le pri nevarnosti hudih krvavitev).

Neodzivnost na transfuzijo trombocitov

Pričakovani porast po infundiranju ene terapevtske enote trombocitov je približno $20 - 30 \times 10^9/L$. Njihovo število nato postopoma upada v naslednjih 72 urah. Če pričakovanega porasta števila trombocitov po transfuziji trombocitov vsaj dvakrat zaporedoma ne dosežemo, govorimo o neodzivnosti na transfuzijo trombocitov. Posledici neodzivnosti na transfuzijo trombocitov sta povečano tveganje za krvavitev in potreba po pogostejših transfuzijah. Zaplet je zlasti kritičen pri

bolnikih, ki potrebujejo redno trombocitno podporo, npr. pri bolnikih s hematološkimi boleznimi kot so akutne levkemije in pri bolnikih po presaditvah krvotvornih matičnih celic.

Do neodzivnosti na transfuzijo trombocitov lahko pride bodisi zaradi neimunskih ali imunskih razlogov. Imunski vzrok so ponavadi bolnikova protitelesa proti humanim levkocitnim antigenom (anti-HLA-I razreda), na trombocitih darovalca ki nastanejo po transfuzijah. Ta protitelesa lahko povzročijo hiter očistek transfundiranih trombocitov. Manj pogosto bolniki razvijejo protitelesa proti človeškim trombocitnim antigenom (HPA), ki podobno odstranjujejo transfundirane trombocite. Pogostost aloimunizacije je odvisna od števila transfuzij, ki jih je bolnik prejel. Neimunski vzroki so lahko bakterijske in virusne okužbe in sepsa, ki lahko pospešijo porabo trombocitov, povišana telesna temperatura (poveča očistek trombocitov), diseminirana intravaskularna koagulacija (razširjeno strjevanje in krvavitve, kar vodi do povečane porabe trombocitov). Možni vzroki so tudi splenomegalija (povečana vranica lahko hitreje uniči trombocite), nekatera zdravila (oslabijo delovanje trombocitov ali njihovo preživetje), aktivne krvavitve ter izventelesna cirkulacija (povzroča poškodbe in hitro porabo trombocitov). Značilno za neimunske vzroke neodzivnosti je, da se število trombocitov po transfuziji sprva primerno poveča, nato pa se trombociti sčasoma porabijo. Nasprotno pa se pri imunskem vzroku število trombocitov ponavadi bistveno ne poveča, ker prihaja do hitrega odstranjevanja s protitelesi.

Diagnoza neodzivnost na transfuzijo trombocitov

Za pravilno obravnavo bolnika pri sumu na neodzivnosti je potrebno:

- spremljati število trombocitov po transfuziji
- narediti oceno porasta trombocitov po transfuziji trombocitov
- izključiti neimunske vzroke (klinična ocena, laboratorijski testi)
- testirati prisotnost HLA in HPA protiteles

Popravljeno povečanje števila (CCI – angl. corrected count increment) je izračun, ki ga uporabljamo za oceno učinkovitosti transfuzije trombocitov. Pomaga nam ugotoviti, kako dobro transfundirani trombociti povečajo bolnikovo število trombocitov. Oceno porasta števila trombocitov naredimo 10 min do 1 ure po transfuziji in po 24 urah z namenom, da dodatno ločimo med imunskim in neimunskim vzrokom refraktornosti. Vrednost CCI $>7.500-10.000/\mu\text{L}$ 1 uro po transfuziji kaže na normalen odziv. Nizek CCI (običajno $<5000/\mu\text{L}$ 1 uro po transfuziji) po več kot 2 zaporednih transfuzijah lahko kaže na neodzivnost.

Formula za izračun CCI je:

$$[(\text{število trombocitov po transfuziji } /\mu\text{L}) - (\text{število trombocitov pred transfuzijo } /\mu\text{L})] \times (\text{telesna površina v m}^2) / (\text{število transfundiranih trombocitov } /\mu\text{L}).$$

Kjer je:

- *Število trombocitov po transfuziji = bolnikovo število trombocitov, izmerjeno 1 uro po transfuziji.*
- *Število trombocitov pred transfuzijo = bolnikovo število trombocitov pred transfuzijo.*
- *Telesna površina (BSA) se običajno izračuna na podlagi pacientove višine in teže.*

Določitev HLA in HPA protiteles

Pri sumu na neodzivnost na transfuzijo trombocitov je koristno določiti HLA in HPA protitelesa s presejalnimi testi. Na voljo je več tehnik na podlagi ELISA ali multiplih ELISA testov, kot je npr. preiskava Luminex. Z njimi določimo prisotnost HLA ali HPA protiteles.

Protitelesa HLA lahko v naslednji stopnji tudi specificiramo z ustreznimi testi in nato opravimo tudi HLA tipizacijo bolnika, s katero potrdimo specifičnost HLA protiteles. Na ta način ugotovimo, kateri fenotipi HLA dajalcev trombocitov bolniku ne ustrezajo. Te preiskave so drage in zamudne in jih zato večina transfuzijskih centrov v svetu rutinsko ne omogoča.

Vodenje bolnika z neodzivnostjo na trombocite

Pri neimunskih oblikah neodzivnosti je ključno zdravljenje osnovne bolezni in prilagoditev terapije. Če je vzrok imunski, priporočajo uporabo HLA oz. HPA identičnih, ali pa vsaj skladnih trombocitov, pri čemer pa imajo vsi kliniki in transfuzijski centri hude težave. HLA in HPA tipizirane krvodajalce je namreč izredno težko zagotoviti, ker večina držav nima dovolj velikih registrov HLA in HPA tipiziranih krvodajalcev. Zato nekateri namesto tega priporočajo izvedbo navzkrižnega preiskusa (NP) za trombocite, ki je analogen NP za eritrocitno transfuzijo in lahko izloči neskladne enote trombocitov. Tudi ta pristop je izredno kompliciran, saj zahteva veliko zalogo ABO, RhD in Kell skladnih trombocitov, njihovo standardizirano vzorčenje za NP, standardne tehnike NP-ja (ki ne obstajajo); obenem pa je situacija še otežena s pojavom multiplih protiteles pri neodzivnih bolnikih.

Zaradi omenjenih težav je ključnega pomena optimizacija transfuzijske prakse. Za zmanjšanje tveganja aloimunizacije je najbolje uporabiti aferezne trombocite z zmanjšanim številom levkocitov, ki jih še dodatno inaktiviramo. Odstranitev levkocitov zmanjša verjetnost razvoja protiteles HLA in posledično verjetnost neodzivnosti. Podobno uporaba afereznih trombocitov z enim darovalcem zmanjša izpostavljenost bolnika v primerjavi z zlitjem trombocitov in zmanjša tveganje aloimunizacije. Seveda so taki aferezni pripravki precej dražji. Transfuzijo dajemo neodzivnemu bolniku počasi in ga pozorno spremljamo, da obvladamo morebitne reakcije. Alternativno priporočajo uporabo intravenskega imunoglobulina (IVIG), ki lahko začasno podaljša življenjsko dobo trombocitov, ali uporabo agonistov trombopoetinskih receptorjev za stimulacijo megakariopoeze.

Bolniki ob neodzivnosti na trombocite lahko podporno prejmejo antifibrinolitik (traneksaminsko kislino). V primeru življenjsko ogrožajoče krvavitve je možna tudi uporaba obvodnega zdravila rFVIIa.

Pri neodzivnem bolniku je potreben multidisciplinarni pristop, ki vključuje hematologa, specialista za transfuzijsko medicino in vse ostalo zdravstveno osebje, ki sodeluje pri obravnavi bolnika. Zdravljenje mora biti individualizirano glede na bolnikovo stanje, institucionalne protokole in razpoložljivost virov.

Zaključek

Neodzivnost na trombocitno plazmo je večinoma posledica neimunskih razlogov, pri katerih je ključno zdravljenje osnovnih bolezni. Pri imunskih vzrokih je potrebno izvesti dodatna testiranja prisotnosti protiteles, jih zgodaj prepoznati in se nato individualno odločiti o ustreznih ukrepih.

Literatura

1. Kaufman RM. Refractoriness to platelet transfusion. In: UpToDate, Kleinman S (Ed), Wolters Kluwer. (Accessed on May 2024).
2. Cohn CS. Platelet transfusion refractoriness: how do I diagnose and manage? Hematology Am Soc Hematol Educ Program (2020) 2020 (1): 527–532.
3. Solh T, Botsford A, Solh M. Glanzmann's thrombasthenia: pathogenesis, diagnosis, and current and emerging treatment options. J Blood Med. 2015 Jul 8;6: 219-27.
4. Sandhya R. Panch, Li Guo, Ralph Vassallo. Platelet transfusion refractoriness due to HLA alloimmunization: Evolving paradigms in mechanisms and management. Blood Reviews, Volume 62, 2023,101135.
5. Debbie Jiang Evidence-Based Minireview: Strategies to manage a severely HLA-alloimmunized patient with refractory thrombocytopenia, Hematology ASH Education Program, 2022
6. Nancy M. Dunbar, Does ABO and RhD matching matter for platelet transfusion? Hematology ASH Education Program, 2020
7. Morris A. Blajchman, New Strategies for the Optimal Use of Platelet Transfusions, Hematology ASH Education Program, 2008

Kronična mieloična levkemija (ZHS)

Rezultati slovenskega registra KML in predlog smerni

Mateja Grat¹, Irena Preložnik Zupan²

1 Splošna bolnišnica Celje, 2 Univerzitetni klinični center Ljubljana,

mateja.grat@sb-celje.si

Register bolnikov s KML zajema vse bolnike v Sloveniji, zdravljene od leta 2000. Do konca leta 2014 smo vpisali 283 bolnikov, do konca leta 2024 pa 470; prirast števila v 10 letih je 61,1 % (173 bolnikov). Povprečna starost ob diagnozi je 56,59 let. Več je moških (55,2 %) kot žensk (44,8 %). Večina bolnikov je bila odkritih v kronični fazi bolezni (95,5 %), zelo malo v pospešeni fazi (1,7 %) in v blastni preobrazbi (2,8 %).

Nizko tveganje po točkovniku ELTS je imelo 74,9 %, visoko tveganje 25,1 %. (opomba: podatki za izračun so bili dostopni pri 430 bolnikih)

Zdravljenih z PKMC je bilo 47 bolnikov (10 %), od tega je 31 bolnikov imelo samo to zdravljenje. Po letu 2002 smo kot prvo zdravljenje izbirali TKI. 331 bolnikov je prejelo imatinib (82,6 %), 69 bolnikov nilotinib (16,0 %) in 6 bolnikov dasatinib (1,4 %). Po PKMC je prejelo TKI 16 bolnikov. V drugi liniji zdravljenja je največ bolnikov prejelo nilotinib in dasatinib, nekoliko manj imatinib, le posamezni pa bosutinib in ponatinib. Končne terapije ki jih prejemajo bolniki danes so raznolike in bodo predstavljene naknadno. V opazovanem obdobju 25 let je umrlo 163 bolnikov (34,8 %). Zajeti so vsi bolniki, zdravljeni v času od leta 2000, diagnozo pa so lahko imeli postavljeno tudi prej.

Akutna mieloična levkemija (ZHS)

Podatki kliničnih raziskav o pomenu spremljanja FLT3-ITD- MRD.

Njetočka Gredelj

Univerzitetni klinični center Ljubljana

njetocka.gredelj.simec@kclj.si

Akutne mieloične levkemije (AML) so heterogena skupina bolezni. Na odločitev o načinu zdravljenja poleg starosti, splošnega stanja in komorbidnosti bolnika vplivajo tudi značilnosti same bolezni. Po klasifikaciji ELN (European LeukemiaNet) se AML razvršča v bolezen nizkega, vmesnega in visokega tveganja odvisno o prisotnosti genetskih in molekularnih sprememb. Določitev minimalne merljive bolezni (MRD) je pomemben napovedni dejavnik tveganja za relaps in dolžino preživetja. MRD določen z RT-PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction) za NPM1, RUNX1-RUNX1T1 in CBFB-MYH11 ter večparametrsko pretočno citometrijo (MFC) sta po smernicah ELN priporočeni metodi za rutinsko spremljanje MRD.

FLT3-ITD (FMS-like tyrosine kinase-3 internal tandem duplication) je ena najpogostejših genetskih in molekularnih nepravilnosti pri bolnikih z AML. Po smernicah ELN iz leta 2022 prisotnost FLT3-ITD uvršča AML v vmesno tveganje. Pri tej skupini bolnikov je potreba po alogenski presaditvi krvotvornih matičnih celic (PKMC) najbolj nejasna, pri odločitvi pa pomembno vpliva status MRD. FLT3-ITD mutacija pogosto predstavlja pozni, subklonalni dogodek v razvoju levkemije in velja za nestabilen marker, saj lahko med relapsom izgine ali pa se pojavi na novo ("de novo") pri bolnikih, ki je prej niso imeli. V preteklosti je FLT3 veljala kot nezanesljiv marker za določanje MRD. Kljub temu je pogost sočasni pojav FLT3-ITD z mutacijo NPM1 omogočal spremljanje MRD z RT-PCR za NPM1.

V zadnjih letih je z razvojem visoko senzitivne metode sekvenciranja naslednje generacije (NGS) mogoče premagati omejitve prejšnjih metod določanja FLT3-ITD MRD. Vendar ima tudi ta metoda svoje pomanjkljivosti, zlasti pri dolgih insercijah in delecijah. Trenutno se še raziskujeta

zanesljivost in klinični pomen spremljanja FLT3-ITD MRD z metodo NGS. Odprta ostajajo vprašanja o potrebi po presaditvi pri MRD-negativnih bolnikih ter o vplivu FLT3-MRD statusa pred in po presaditvi na izid zdravljenja. Raziskuje se tudi potreba po vzdrževalni terapiji s FLT3 inhibitorji po intenzivni kemoterapiji in alogenski PKMC.

Več študij je pokazalo, da imajo FLT3-ITD MRD pozitivni bolniki več relapsov in krajše celotno preživetje.

Grob in sodelavci so analizirali skupino 161 bolnikov, ki so po dveh krogih intenzivnega zdravljenja dosegli kompletno remisijo (< 5 % blastov v kostnem mozgu), pri čemer je bilo 47 (29 %) bolnikov še vedno FLT3-ITD MRD pozitivnih po metodi NGS. Noben bolnik z istočasno mutacijo FLT3-ITD in NPM1 po dveh krogih zdravljenja ni bil FLT3-ITD MRD pozitiven. Pri vseh MRD pozitivnih bolnikih so bile mutacije FLT3-ITD enake kot ob diagnozi (sekvenca, lokacija in dolžina), pri petih bolnikih so zaznali več klonov. FLT3-MRD pozitivni bolniki so imeli statistično značilno višjo štiriletno kumulativno incidenco relapsov in krajše preživetje. Študija je tudi pokazala več relapsov in slabše preživetje po alogenski PKMC pri bolnikih, ki so bili FLT3 - MRD pozitivni. Prognostična vloga FLT3-ITD MRD je bila podobna ne glede na to, ali so bolniki prejeli mieloablativno kondicioniranje (MAC) ali kondicioniranje z nižjo intenziteto (RIC), čeprav so imeli bolniki po MAC nižjo stopnjo relapsov. Nemška raziskovalna skupina (Rucker in sodelavci) je objavila podatke o vplivu FLT3-ITD MRD na izid zdravljenja z intenzivno kemoterapijo (IK) in midostaurinom ter alogensko PKMC. Zaradi večje občutljivosti testiranja je bil MRD določen iz kostnega mozga. Bolniki, ki so po dveh ciklih IK in midostaurina dosegli negativni NGS FLT3-MRD status, so imeli statistično značilno nižjo štiriletno kumulativno incidenco relapsov (CIR) in daljše preživetje v primerjavi z MRD pozitivnimi bolniki. Alogenska PKMC v prvi kompletni remisiji (CR1) je napovedni dejavnik za nižji CIR, vendar ni vplivala na celotno preživetje. MRD pozitivnost pred alogensko PKMC je bila povezana s pogostejšimi relapsi in slabšim celotnim preživetjem.

Podobni izidi zdravljenja so bili opaženi pri MRD negativnih bolnikih, ki so bili zdravljeni le z IK, in MRD pozitivnih bolnikih, ki so prejeli alogensko PKMC. Konverzija MRD negativnosti v MRD

pozitivnost ali MRD pozitivni status kadarkoli med spremljanjem sta bila povezana z višjim tveganjem za relaps in krajšim preživetjem. Bolniki, ki so po dveh ciklih IK (+ midostaurin) dosegli MRD negativnost v kostnem mozgu, so imeli dobro prognozo z nizkim CIR in daljšim preživetjem. NPM1 mutacija in alogenska presaditev sta prav tako povezana z nizkim CIR, vendar ne vplivata na celotno preživetje. Bolniki, ki so FLT3-ITD MRD pozitivni in hkrati NPM1 MRD pozitivni, imajo najslabšo prognozo. Dobro prognozo imajo bolniki, ki so FLT3-ITD MRD negativni, ne glede na status NPM1 MRD. To pomeni, da FLT3-ITD MRD bolje razlikuje bolnike z ugodno prognozo od tistih s slabo prognozo.

Leta 2022 so objavljeni rezultati avstralsko-britanske raziskovalne skupine o vplivu predtransplantacijskega določanja MRD FLT3-ITD z metodo visoko senzitivnega PCR-NGS na izhod presaditve. Loo in sodelavci so analizirali podatke 104 bolnikov z mutacijo FLT3-ITD, ki so bili po intenzivni kemoterapiji (četrtna bolnikov je sočasno prejela tudi FLT3 inhibitor) zdravljeni z alogensko PKMC. Noben bolnik po alogenski PKMC ni prejemal vzdrževalne terapije. FLT3-ITD je bil določen z metodo PCR-NGS in kapilarno elektroforezo (CE); pri bolnikih, ki so bili pozitivni na NPM1, je bil izveden tudi RT-PCR za NPM1. Pred presaditvijo je imelo 37 % vseh bolnikov FLT3 MRD pozitivno bolezen po metodi PCR-NGS, medtem ko je bila po CE metodi MRD-pozitivna le 19 % bolnikov. Rezultati analiz vzorcev iz kostnega mozga in periferne krvi so bili skladni. Bolniki, ki so bili FLT3- MRD pozitivni po PCR-NGS metodi, so imeli slabše celotno preživetje in več relapsov. Dveletno preživetje brez relapsa je bilo povezano z ravni izražanja FLT3-ITD po metodi PCR-NGS. Študija je pokazala komplementarnost kliničnega pomena določanja MRD FLT3-ITD z visoko senzitivno metodo PCR-NGS in določanja MRD NPM1 z RT-PCR. Najboljše izhode so imeli bolniki, ki so bili negativni na obeh testih MRD, najslabše pa tisti, ki so bili pozitivni na obeh. Pokazalo se je tudi, da mieloablativna kondicioniranja (MAC) pred alo-PKMC ne more odpraviti negativnega vpliva pozitivnega MRD na preživetje brez relapsa in celotno preživetje. Zaključek študije je bil, da FLT3-ITD MRD, določen po visoko senzitivni metodi PCR-NGS, vpliva na izhod zdravljenja, tudi kadar je raven izražanja FLT3-ITD zelo nizka.

Na podlagi teh rezultatov se lahko pričakuje razvoj posttransplantacijskih strategij, temelječih na MRD FLT3-ITD. Ena od teh je vzdrževalna terapija z gilteritinibom po alo-PKMC. V študiji Morpho je bilo 156 bolnikov po alogenski PKMC randomizirano v skupini z vzdrževalnim zdravljenjem z gilteritinibom ali s placebom. V celotni skupini vzdrževalna terapija z gilteritinibom ni vplivala na preživetje brez relapsa in število relapsov. Pri bolnikih, ki so bili FLT3-MRD pozitivni pred in/ali po alo-PKMC (50,1 %), je bila z vzdrževalno terapijo gilteritinibom dosežena značilno daljša življenjska doba brez relapsa. Študija je tudi pokazala da količina FLT3-ITD MRD močno korelira z izidom. Zaključno lahko rečemo, da podatki ilustrirajo potencialno uporabnost visoko senzitivnega NGS FLT3-ITD MRD testa pri obravnavanju bolnikov s FLT3-ITD AML ter da v prihodnosti lahko pričakujemo njegovo rutinsko klinično uporabo.

Literatura

1. Rucker FG, et al, Measurable residual disease monitoring in AML with FLT3-ITD treated with intensive chemotherapy plus midostaurin. Blood Adv. 2024 Dec 10;8(23):6067-6080.
2. Grob T, et al. Prognostic Value of FLT3-Internal Tandem Duplication Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol. 2023 Feb 1;41(4):756-765.
3. Loo S. Pretransplant FLT3-ITD MRD assessed by high-sensitivity PCR-NGS determines posttransplant clinical outcome, Letter to Blood| December 1, 2022
4. Tiong IS, et al. Targeting Measurable Residual Disease (MRD) in Acute Myeloid Leukemia (AML): Moving beyond Prognostication. Int J Mol Sci. 2023Mar 1;24(5):4790.
5. Levis MJ, et al. Gilteritinib as Post-Transplant Maintenance for AML With Internal Tandem Duplication Mutation of FLT3. J Clin Oncol. 2024May 20;42(15):1766-1775.

Potek in omejitve določanja MRD pri FLT3-ITD

Sandra Sućurović, Helena Podgornik

Univerzitetni klinični center Ljubljana

sandra.sucurovic@kclj.si

Mutacije v genu FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) so pri bolnikih z AML pogoste in sodijo med pozne dogodke levkemogeneze, katerih predhodnice so mutacije v drugih genih, zlasti v NPM1 (~55 %) ter DNMT3A (~45 %) (1). Poznamo dve glavni skupini mutacij v FLT3 (2):

- interne tandemske ponovitve v jukstamembranski domeni receptorja (FLT3-ITD) ter
- točkovne mutacije v tirozin kinazni domeni (TKD).

FLT3-ITD se pojavljajo pri 10-15 % odraslih z AML, torej gre za najpogostejšo mutacijo pri AML. Točkovne mutacije FLT3-TKD najdemo pri 7-10 % bolnikov z AML, med njimi je najpogostejša D835, ob njej pa prepoznavamo ob postavitvi diagnoze ali kasneje ob ponovitvi bolezni še številne druge. Ne glede na to, za katero od zgoraj navedenih mutacij gre, je njena posledica od signalizacije neodvisno celično preživetje (3).

V trenutno veljavni razvrstitvi tveganja evropske mreže za levkemije (ELN), vse bolnike s FLT3-ITD razvrščamo v vmesno skupino ne glede na sočasne mutacije (4). Uvajanje inhibitorjev FLT3 (FLT3i) je sicer izboljšalo preživetje bolnikov, vendar jih 40 % še vedno relapsira (5). Čeprav se je določanje merljivega preostanka bolezni (MRD) močno uveljavilo pri spremljanju zdravljenja bolnikov z AML, pa mutacije v FLT3 niso priporočene kot ustrezen označevalec spremljanja MRD. Prvi in glavni razlog je njihova nestabilnost, ki je splošna značilnost poznih genetskih dogodkov. Mutacije v genih, povezanih s signalizacijo, so obenem pogosto subklonalne. Približno polovica bolnikov, zdravljenih s FLT3i, ob relapsu mutacije torej nima več. Drugi razlog pa je njihovo sopojavljanje z drugimi ustrežnejšimi označevalci, kakršen je NPM1 ali fuzijski geni (6). Bolnikov s sopojavljanjem stabilnejših označevalcev je okrog 70 % (7).

Izguba mutacije v FLT3 ob ponovitvi bolezni je torej glavni razlog, zakaj v zadnjih veljavnih smernicah ELN ni bila navedena med označevalci, primernimi za spremljanje MRD. Z izredno občutljivimi metodami pa lahko klon vseeno zaznamo in zgolj v taki tehnični izvedbi je določanje

MRD pri FLT3 smiselno. Ugotovili so namreč, da imajo bolniki z zaznavnim MRD po zdravljenju s FLT3i zelo veliko verjetnost relapsa bolezni (1, 8, 9), obenem pa prepoznavanje MRD omogoča zgodnjo intervencijo z zdravljenjem s FLT3i (7).

Težava določanja MRD pri FLT3-ITD pa ni zgolj v sami nestabilnosti glede na stanje bolezni, pač pa tudi v zaporedju mutacije same, njenem nahajališču in dolžini podvojitve. FLT3-ITD so namreč izjemno heterogena, za bolnika specifična skupina »in frame« duplikacij velikosti 3 do 1236 bp v eksonih 14 ter 15 gena FLT3. Ta heterogenost je ob raznolikosti insercijskih mest ključni razlog temu, da je qPCR, ki se za določanje MRD sicer največkrat uporablja, pri tej mutaciji neuporabna metoda. Druga tehnična težava je, da je pri FLT3-ITD divji tip (drugi alel), ki je vselej prisoten v reakcijski mešanici, krajši od mutiranega, in se pri PCR preferenčno pomnožuje, kar vodi do lažno nižjih rezultatov. Na PCR temelječe metode imajo pri FLT3-ITD mejo zaznave le 1% (10). Da bi torej zaznali FLT3-ITD kot MRD, je potrebno uporabiti drugo metodo.

Trenutno je edina alternativna metoda pri FLT3-ITD sekvenciranje naslednje generacije (NGS). Če uporabljamo NGS, moramo najprej zadostiti zahtevam, ki jih je za to metodo določanja MRD splošno predpisal ELN. Od analitičnih parametrov moramo določiti linearnost ter mejo zaznave. Meja zaznave naj bi dosegla vsaj 10^{-5} , zaželeno je 10^{-6} . Smernice predpisujejo, da izračunamo občutljivost iz povprečne napake ozadja, pri čemer je zahtevano število odčitkov gena FLT3 vsaj 100 000. MRD+ poročamo takrat, ko zaznamo vsaj 10 odčitkov mutacije (6). Če običajno pri NGS z uporabo panelov dosegamo pokritje 1000x, gre torej za 100x več odčitkov na gen. To je pomembna informacija, ker število odčitkov oziroma pokritje določata ceno sekvenciranja. Nekateri laboratoriji za določanje MRD pri FLT3-ITD sicer uporabljajo kar mieloične panele, ki se sicer uporabljajo pri diagnostični obravnavi, pri čemer služijo ostali geni kot negativne kontrole, kar je njihova prednost. Upoštevati pa je potrebno tudi navodilo, da v isto sekvenciranje ne dajemo diagnostičnih vzorcev, ker lahko prisotnost mutacije v FLT3-ITD diagnostičnega vzorca kontaminira vzorec, pri katerem določamo MRD. Zaradi te zahteve in predvsem zaradi doseganja ustreznega pokritja se vse bolj uveljavljajo ločeni kompleti, ki služijo zgolj določanju FLT3-ITD.

Glede na vse več študij o pomenu določanja FLT3-ITD v kratkem pričakujemo tudi smernice, ki bodo jasno določile vse potrebne parametre, da je določanje MRD ne le analitsko ustrezno, pač pa tudi dejansko uporabno pri kliničnih odločitvah.

Literatura

1. Grob T, Sanders MA, Vonk CM, Kavelaars FG, Rijken M, Hanekamp DW, et al. Prognostic value of FLT3-internal tandem duplication residual disease in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2022;41:756–65.
2. Reikvam, H. Revisiting the prognostic role of FLT3 mutations in acute myelogenous leukemia. *Expert Rev. Hematol.* 2023;16, 317–323
3. Kazi, J.U.; Rönstrand, L. FMS-like Tyrosine Kinase 3/FLT3: From Basic Science to Clinical Implications. *Physiol. Rev.* 2019;99, 1433–1466.
4. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood.* 2022;140(12):1345-1377.
5. Döhner H, Weber D, Krzykalla J, Fiedler W, Wulf GG, Salih HR, et al. Midostaurin plus intensive chemotherapy for younger and older patients with AML and FLT3 internal tandem duplications. *Blood Adv.* 2022;6:5345–55.
6. Heuser M, Freeman SD, Ossenkoppele GJ, Buccisano F, Hourigan CS, Ngai LL, et al. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood.* 2021;138:2753–67.
7. Othman J, Potter N, Mokretar K, Taussig D, Khan A, Krishnamurthy P. FLT3 inhibitors as MRD-guided salvage treatment for molecular failure in FLT3 mutated AML. *Leukemia.* 2023 Oct;37(10):2066-2072.
8. Loo S, Dillon R, Ivey A, Anstee NS, Othman J, Tiong IS, et al. Pretransplant FLT3-ITD MRD assessed by high-sensitivity PCR-NGS determines posttransplant clinical outcome. *Blood.* 2022;140:2407–11.

9. Dillon LW, Gui G, Page KM, Ravindra N, Wong ZC, Andrew G, et al. DNA sequencing to detect residual disease in adults with acute myeloid leukemia prior to hematopoietic cell transplant. *JAMA*. 2023;329:745–55
10. Levis MJ, Perl AE, Altman JK, et al. A next-generation sequencing-based assay for minimal residual disease assessment in AML patients with FLT3-ITD mutations. *Blood Adv*. 2018;2(8):825-831.

Pomen sledenja NPM1 MRD in naše izkušnje

Nika Kraljič, Helena Podgornik

Univerzitetni klinični center Ljubljana

nika.kraljic@kclj.si

Akutna mieloična levkemija (AML) z mutacijo *NPM1* predstavlja eno največjih podskupin novoodkritih mieloičnih levkemij pri odraslih, saj zajema približno tretjino vseh primerov (30–35 %), z rahlo žensko predominanco. Mutacije v genu *NPM1* so ključni genetski dogodki, ki v kombinaciji z mutacijami drugih genov, kot so *DNMT3A*, *IDH1/2* ali *RAS*, prispevajo k razvoju levkemije. Zaradi svojih edinstvenih značilnosti je AML z mutacijo *NPM1* prepoznana kot ločena entiteta v zadnjih smernicah European Leukemia Net (ELN) 2022 ter v 5. izdaji klasifikacije Svetovne zdravstvene organizacije (WHO).

Po WHO smernicah se diagnoza AML z mutacijo *NPM1* postavi ne glede na odstotek, medtem ko ELN smernice zahtevajo več kot 10 % blastov v kostnem mozgu za dokončno diagnozo. Določanje mutacijskega statusa *NPM1* in *FLT3* je danes ključni del rutinske diagnostike akutne levkemije, saj omogoča natančno genetsko razvrstitev tveganja in diferenciacijo med različnimi podskupinami AML. Bolniki z AML, ki imajo mutacijo *NPM1* brez pridružene *FLT3* mutacije, spadajo v skupino z ugodno prognozo. V primeru sočasne *FLT3* mutacije je prognoza vmesna, medtem ko prisotnost kompleksno preurejenega kariotipa privede do neugodne prognostične skupine.

Diagnostični postopki in molekularno spremljanje

Čeprav so mutacije v *NPM1* raznolike, pa se v veliki večini nahajajo v eksonu 12. Določamo jih z različnimi genetskimi metodami. Za prepoznavo prisotnosti mutacije uporabljamo hitre in enostavne, za natančnejšo opredelitev pa sekvenciranje. Metoda NGS lahko zazna tudi mutacije zunaj eksona 12, ki so prav tako prognostično pomembne. Mutacije v *NPM1* so specifične za AML, odsotne v zdravih tkivih in prelevkemičnih stanjih, ter se ob ponovitvi bolezni ponovno pojavijo, kar jih postavlja v ospredje kot odlično tarčo za spremljanje merljivega preostanka bolezni (MRD). Spremljanje MRD temelji na kvantitativni metodi qRT-PCR, ki je izjemno občutljiva, zlasti pri

uporabi vzorcev kostnega mozga (občutljivost je za približno 1 desetiški logaritem nižja, če se uporabi periferna kri).

Klinične implikacije spremljanja MRD

Sledenje MRD z metodo qRT-PCR ima več ključnih kliničnih aplikacij:

- Ocena MRD po indukcijskem zdravljenju napoveduje tveganje za ponovitev bolezni in celokupno preživetje ter pripomore k preoblikovanju prognostične skupine znotraj ELN klasifikacije.
- Preverjanje MRD pred alogeno presaditvijo hematopoetskih matičnih celic pomaga pri prilagoditvi samega kondicioniranja in vodenja bolnika tekom presaditve.
- Redno spremljanje MRD omogoča zgodnje zaznavanje molekularnega relapsa, ter pravočasno ukrepanje

Podatki iz raziskav, kot so nemška AMLSG 0704 in francoska ALFA 0702, poudarjajo prognostični pomen doseganja MRD negativnosti v zgodnjih fazah zdravljenja. MRD negativnost po 2. krogu zdravljenja je povezana z bistveno boljšim 4-letnim preživetjem (90 % proti 51 %), medtem ko francoska raziskava izpostavlja znižanje MRD za 4 logaritme po 1. krogu zdravljenja kot najpomembnejši prognostični kazalnik.

Spremljanje MRD je pomembno tudi pri bolnikih, ki so zdravljeni s protokoli osnovanimi na venetoclaxu, kjer naj bi bolniki, ki dosežejo MRD negativnost po 4 krogih imeli bistveno boljše preživetje kot tisti, ki ostanejo MRD pozitivni.

Ocena MRD po zaključku zdravljenja je ključna za spremljanje tveganja ponovitve bolezni. Bolniki, ki po koncu zdravljenja ostanejo MRD pozitivni, imajo večje tveganje za ponovitev bolezni. Kljub temu del MRD pozitivnih bolnikov ostane v dolgoročni remisiji, nekateri pa celo spremenijo svoj MRD status iz pozitivnega v negativnega brez dodatnega zdravljenja. Dodatno tveganje za zgodnejšo ponovitev bolezni predstavlja prisotnost *FLT3* mutacije ob diagnozi in nezmožnost znižanja MRD začetne vrednosti za 4 logaritme. Angleško-avstralska raziskava je pokazala, da je kar 93 % bolnikov s tema dvema dejavnikoma doživelo ponovitev bolezni znotraj enega leta.

Bolniki z mutacijo v *NPM1*, imajo največje tveganje za ponovitev bolezni v obdobju 2–3 let po zdravljenju, zato je v tem času izredno pomembno redno spremljanje MRD. Da bi se izognili nepotrebnemu dodatnemu zdravljenju MRD pozitivnih bolnikov, so smernice jasne: ponovitev bolezni oziroma molekularna ponovitev bolezni je definirana z vsaj dvema zaporednima tehnično ustreznima MRD pozitivnima vzorcema, kjer se pri predhodno MRD negativnih bolnikih status spremeni v pozitivnega. Pri predhodno MRD pozitivnih bolnikih je za molekularno napredovanje bolezni opredeljeno povečanje MRD vrednosti za en desetiški logaritem.

Glede na najnovejše smernice ELN je priporočeno spremljanje *NPM1* MRD še 2–3 leta po zaključku zdravljenja. Priporočljivo je, da se vzorci kostnega mozga analizirajo vsake tri mesece ali pa vzorci periferne krvi vsakih šest tednov.

Naše izkušnje

Na Kliničnem oddelku za hematologijo, UKC Ljubljana smo med 1. junijem 2021 in 1. junijem 2024 obravnavali 88 bolnikov z *NPM1*-pozitivno akutno mieloično levkemijo. Od tega je bilo 53 (60 %) žensk in 35 (40 %) moških. Mediana starost ob postavitvi diagnoze je bila 65 let. Pri 31 (35 %) bolnikih nismo spremljali *NPM1* MRD zaradi visoke starosti in običajno slabe prognoze, zato smo te bolnike izključili iz nadaljnje analize. Podrobneje smo analizirali 57 bolnikov, pri katerih smo spremljali *NPM1* MRD.

Pridruženo *FLT3* mutacijo je imelo 23 (40 %) bolnikov. Nihče od bolnikov ni imel kompleksno preurejenega kariotipa. Spremembe v kariotipu je imelo 7 bolnikov, medtem ko so preostali bolniki imeli normalen kariotip. Po končanem zdravljenju je *NPM1* MRD negativnost doseglo 29 (51 %) bolnikov. V indukcijski terapiji je bilo večina bolnikov (75 %) zdravljenih z DA 3+7, nekaj tudi z DAC 3+5+7 (16 %), medtem ko je bil 1 bolnik zdravljen s kombinacijo azacitidina in venetoclaxa. Alogeno presaditev kostnega mozga je potrebovalo 23 bolnikov, od tega 2 bolnika ob ponovitvi bolezni. Pri 11 bolnikih, ki so prejeli alogeno presaditev kostnega mozga, je bila prisotna tudi sočasna *FLT3* mutacija. Sedem bolnikov je šlo v presaditev s pozitivnim *NPM1* MRD. Pri 12 bolnikih, ki so bili vmes MRD negativni, je prišlo do ponovitve bolezni. Ponovitev bolezni je bila opažena tudi pri 2 bolnikih, ki nista nikoli dosegla MRD negativnosti, vendar se je začetna vrednost

znižala za vsaj tri desetiške logaritme. Od skupno 14 bolnikov, pri katerih je prišlo do ponovitve bolezni, jih je 7 imelo pridruženo *FLT3* mutacijo, medtem ko podatki o pridruženi *FLT3* mutaciji pri 2 bolnikih niso bili na voljo.

Povprečni čas od začetka bolezni do pozitivnega MRD je bil 18 mesecev. Od 14 bolnikov, pri katerih je prišlo do ponovitve bolezni, jih je bilo ob naši analizi še 7 (50 %) živih. *NPM1* MRD smo v večini primerov (63 %) spremljali v periferni krvi. Ob analizi je bilo živih 68 % vseh podrobneje analiziranih bolnikov.

Zaključek

Natančno spremljanje MRD pri AML z mutacijo *NPM1* je ključno za optimizacijo zdravljenja in izboljšanje preživetja bolnikov. Po smernicah ELN je priporočeno spremljanje MRD z metodo qRT-PCR v obdobju 2–3 let po zaključenem zdravljenju, bodisi z vzorci kostnega mozga vsake 3 mesece ali z vzorci periferne krvi vsakih 6 tednov. Pridobljeni podatki omogočajo pravočasno ukrepanje in zmanjšujejo tveganje nepotrebnih terapevtskih posegov, hkrati pa natančno napovedujejo klinični izid bolezni.

Literatura

1. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022 Sep 22;140(12):1345–77.
2. Falini B, Dillon R. Criteria for Diagnosis and Molecular Monitoring of *NPM1* -Mutated AML. *Blood Cancer Discov*. 2024 Jan 8;5(1):8–20.
3. 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 Jul;36(7):1703–19.
4. Falini B, Brunetti L, Sportoletti P, Martelli MP. *NPM1*-mutated acute myeloid leukemia: from bench to bedside. *Blood*. 2020 Oct 8;136(15):1707–21.

5. Eckardt JN, Bill M, Rausch C, Metzeler K, Spiekermann K, Stasik S, et al. Secondary-type mutations do not impact outcome in NPM1-mutated acute myeloid leukemia – implications for the European LeukemiaNet risk classification. *Leukemia*. 2023 Nov;37(11):2282–5.
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022 Sep 15;140(11):1200–28.

Pomen vzdrževalnega zdravljenja z oralnim azacitidinom, vloga indukcije in pridruženih genetskih nepravilnost

Mihela Šajn, Enver Melkić

Univerzitetni klinični center Ljubljana

mihela.sajn@kclj.si

Uvod

Oralna oblika hipometilirajočega agensa azacitidina, ki ni bioekvivalent subkutane formulacije, je odobrena za vzdrževalno zdravljenje bolnikov v remisiji akutne mieloične levkemije (AML) po intenzivnem kemoterapevtskem zdravljenju, ki niso primerni za nadaljevanje zdravljenja z alogensko transplantacijo kostnega mozga (alo PKMC). Zdravimo do ponovitve bolezni oz. nesprejemljive toksičnosti zdravila.

Evropska agencija za zdravila (EMA) je oralni azacitidin odobrila na podlagi študije QUAZAR AML-001, v katero so vključili 472 bolnikov (mediana starost 68 let) z AML s srednjim ali visokim tveganjem za ponovitev bolezni. Polovica bolnikov, ki je po doseženi remisiji AML prejela vzdrževalno zdravljenje z oralnim azacitidinom 300 mg 1x dnevno 14 zaporednih dni v 28 dnevnem ciklusu, je imela boljše srednje preživetje (24,7 mesecev vs. 14,8 mesecev od pričetka vzdrževalnega zdravljenja) in čas do ponovitve bolezni (10,2 mesecev vs. 4,8 mesecev od pričetka vzdrževalnega zdravljenja) v primerjavi s skupino, ki je prejela placebo. 85 % bolnikov je pred pričetkom vzdrževanja prejelo vsaj 2 ciklusa intenzivne kemoterapije. Čas do napredovanja bolezni je bil ob vzdrževanju daljši ne glede na število predhodnih kemoterapij. Če bolniki niso prejeli konsolidacije je bil 1x daljši (za 4,5 meseca), če so prejeli eno ali dve konsolidaciji, se je podaljšal za približno 2x, preživetje pa je bilo daljše za 15-20 %.

V kasnejših multivariatnih analizah se je izkazalo, da je oralni azacitidin znatno izboljšal preživetje neodvisno od statusa mutacij NPM1 ali FLT3, citogenetskega tveganja ali statusa MRD po indukcijskem zdravljenju.

Na ASH srečanju (decembra 2024) je skupina zdravnikov iz Južne Floride predstavila lastne podatke 65. bolnikov na vzdrževalnem zdravljenju z oralnim azacitidinom. Vključili so tudi bolnike z nizkim tveganjem (46,2 %). Najpogostejše mutacije so bile NPM1 (44,6 %), FLT-ITD/TKD (27,7 %), NRAS (24,6 %) in IDH 1/2 (13,8 %). Pri 17. bolnikih je vzdrževalno zdravljenje predstavljalo uspešno premostitev do alo PKMC. Ko so te bolnike izključili iz statističnih analiz, je bil mediani čas preživetja v obdobju enega leta 82,3 %, najboljši 95,2 %, pa je bil v skupini z mutacijo NMP1. V tej skupini je bil čas do napredovanja bolezni 26,9 mesecev in 6- oz. 12- mesečno preživetje 80,0 % in 53,3 %.

Na istem srečanju je skupina zdravnikov iz Severne Karoline predstavila prve podatke desetih bolnikov iz klinične prakse, ki so prejeli vzdrževalno zdravljenje z oralnim azacitidinom po indukcijskem zdravljenju s subkutanim/intravenskim azacitidinom oz. intravenskim decitabinom in venetoklaksom (AZA-VEN). Za vzdrževalno zdravljenje so se odločili zaradi hudih citopenij po AZA-VEN. 40% bolnikov je imelo nizko tveganje za ponovitev bolezni, polovica NPM1 mutacijo. Pred pričetkom vzdrževalnega zdravljenja so prejeli povprečno 5 ciklov AZA-VEN. Median čas do ponovitve bolezni je bil 19,1 mesecev in preživetje 20 mesecev. Ob napredovanju bolezni so pri enem od bolnikov po 6,6 mesecih vzdrževanja ponovno pričeli z VEN-AZA. 6 od 10 bolnikov je bilo med vzdrževanjem vsaj enkrat hospitaliziranih, česar pa razen v enem primeru (febrilna nevtropenija) niso povezali z zdravljenjem samim. Večino manjših zapletov zdravljenja so uspešno rešili s prilagoditvijo odmerka oralnega azacitidina in podpornim zdravljenjem.

Leto prej (decembra 2023) so na ASH srečanju predstavili dodatne izsledke iz QUAZAR študije, in sicer NGS analizo pri bolnikih pred pričetkom vzdrževalnega zdravljenja z oralnim azacitidinom, med vzdrževanjem in ob relapsu bolezni. Najpogostejše zaznane mutacije pred pričetkom vzdrževanja (> 5 % bolnikov) so bile DNMT3A (28,4 %), TP53 (15,5 %), IDH2 (12,3 %), TET2 (11,9 %), SRSF2 (11,0 %), IDH1 (6,1 %) in ASXL1 (5,5 %). Ob relapsu so primerjali NGS pri bolnikih z vzdrževalnim zdravljenjem in brez njega. RAS mutacija je bila pogostejša v skupini s placebom. Čas

do napredovanja bolezni je bil ne glede na mutacijsko analizo boljši pri bolnikih na vzdrževalnem zdravljenju. Spekter mutacij ob ponovitvi je bil med obema skupinama podoben, kar nakazuje, da vzdrževanje podaljša remisijo, ne da bi spremenilo mutacijsko heterogenost.

Zaključek

Oralni azacitidin je učinkovito zdravilo za preprečevanje ponovitve AML pri bolnikih po intenzivnem kemoterapevtskem zdravljenju, ki niso primerni za nadaljevanje zdravljenja z alo PKMC. V UKC Ljubljana imamo izkušnje z dvema bolnikoma, eno zdravljenje še prejema, pri drugem se je bolezen ponovila in sedaj prejema zdravljenje z AZA-VEN. V prihodnosti bomo morda oralno obliko azacitidina uporabljali tudi po zdravljenju z AZA-VEN.

Literatura

1. Wei AH, Döhner H, Pocock C, Montesinos P, Afanasyev B, Dombret H, et al: QUAZAR AML-001 Trial Investigators. Oral Azacitidine Maintenance Therapy for Acute Myeloid Leukemia in First Remission. *N Engl J Med.* 2020;383(26):2526-2537.
2. Döhner H, Wei AH, Roboz GJ, Montesinos P, Thol FR, Ravandi F, et al. Prognostic impact of NPM1 and FLT3 mutations in patients with AML in first remission treated with oral azacitidine. *Blood.* 2022;140(15):1674-1685.
3. Lopes De Menezes D, Ugidos Guerrero M, Amzallag A, See WL, Risueno A, Kyriakopoulos C, et al. Clonal Dynamics of Gene Mutations during Oral Azacitidine Maintenance Therapy in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML): Outcomes from the QUAZAR AML-001 Trial. *Blood.* 2023;142(Supplement 1):1582.
4. Gardeney H, Torregrosa J, Brechet M, Moya N, Dindinaud E, Basle C, et al. Oral Azacitidine Maintenance after Front-Line Treatment with Azacitidine and Venetoclax in Elderly AML Patients. Single Center Experience. *Blood.* 2024;144(Supplement 1):5947.
5. Krishnamurthy P, Houghton K, Lorenz N, Williams P, Currie L, Vigil CE et al. Real-World Treatment Patterns and Outcomes with Oral Azacitidine Maintenance Therapy in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Blood.* 2024;144(Supplement 1):2425.

Mesto CPX 351 pri zdravljenju AML- naše izkušnje

Klara Šlajpah¹, Mojca Dreisinger²

1 Univerzitetni klinični center Ljubljana, 2 Univerzitetni klinični center Maribor

klara.slajpah@kclj.si

Uvod

Za akutno mieloično levkemijo (AML) večinoma zbolevalo posamezniki, starejši od 65 let, mediana starosti ob postavitvi diagnoze je 67 let. Vedno boljše poznavanje biologije bolezni in razvoj številnih novih zdravil v zadnjem desetletju je izrazito spremenilo način zdravljenja. Zdravljenje postaja individualizirano, prilagojeno bolnikovim psihofizičnim sposobnostim/komorbidnostim in molekularno-citogenetskimi značilnostim AML. Prav slednje igrajo pomembno vlogo pri izbiri zdravljenja v zadnjih letih, saj je vse več podatkov o tem, katero zdravilo je najučinkovitejše pri določenih mutacijah in podtipih AML. Z določevanjem somatskih mutacij najdemo vse več bolnikov, ki imajo AML z mielodisplastičnimi spremembami (AML-MRC). Zaradi učinkovitega zdravljenja solidnih tumorjev in boljšega preživetja hematoloških bolnikov imamo tudi več bolnikov z AML, ki je povezana s predhodno terapijo (t-AML). Tako pri AML-MRC in t-AML je uspeh zdravljenja s standardno kemoterapijo (KT) slabši. Za te bolnike je na voljo zdravljenje s CPX-351, ki je liposomalna formulacija dveh citostatikov, citarabina in daunorubicina v molarjem razmerju 5:1. Zaradi liposomalne sestave je sproščanje citostatikov postopno, izboljšana je dostava zdravil v levkemične celice in manj je neželenih sopojevov v primerjavi s standardno kemoterapijo.

Klinične prednosti CPX-351

Klinične študije so pokazale, da zdravljenje s CPX-351 vodi do boljšega celokupnega preživetja (9,3 vs 5,9 mesecev) in stopnje kompletnega odgovora (47,7 % vs 33,3 %) v primerjavi s standardno KT (DA3+7) pri bolnikih z AML-MRC in t-AML med 60. in 75. letom starosti. 5-letno preživetje je še vedno slabo (18 %), vendar izboljšano v primerjavi z DA3+7 (8 %). Poleg tega je bilo manj zgodnje 60-dnevne umrljivosti (14 % vs 21 %) in manj neželenih sopojevov pri bolnikih zdravljenih s CPX-

351. Retrospektivni podatki iz realne klinične prakse kažejo tudi na boljšo doseganje MRD negativnosti s CPX-351 v primerjavi s standardno KT in s tem boljše celokupno preživetje.

CPX-351 ali hipometilacija v kombinaciji z venetoklaksom?

CPX-351 je postal prva izbira zdravljenja pri starejših bolnikih nad 60 let s sekundarno AML, ki so brez pomembnih pridruženih obolenj. Kljub boljšim rezultatom zdravljenja v primerjavi s standardno KT, je še vedno visok odstotek citopenij in s tem povezanih pomembnih okužb. Tudi trajanje do regeneracije nevtrofilcev in trombocitov je dolgo. Hipometilacijski agensi (HMA) v kombinaciji z venetoklaksom (VEN) dosegajo podobne odstotke odgovorov na zdravljenje kot CPX-351, vendar nimamo na voljo podatkov iz randomiziranih študij. Iz primerjalnih podatkov je razvidno, da je preživetje bolnikov, ki so prejeli CPX-351 (12 mesecev) podobno kot pri bolnikih zdravljenih z HMA-VEN (10 mesecev), ampak da je pri obeh skupinah ključna za dolgoročno preživetje alogenična presaditev krvotvornih matičnih celic (aloPKMC). Odstotek febrilnih nevtropenij je bil v skupini s CPX-351 90 %, pri HMA-VEN 54 %, tudi trajanje hospitalizacije je bilo pri bolnikih zdravljenih s CPX-351 pomembno daljše (41 vs 15 dni). Pomemben je tudi podatek iz retrospektivnih študij, da je 12-mesečno preživetje bolnikov po aloPKMC, ki so za indukcijsko zdravljenje prejeli HMA-VEN enako kot če so prejeli intenzivno KT (76,3 % vs 74,7 %).

Naše izkušnje zdravljenja s CPX-351

Na Kliničnem oddelku za hematologijo UKC Ljubljana smo v obdobju od maja 2022 do marca 2025 po shemi CPX-351 zdravili 15 bolnikov s sekundarno AML. Od tega je 13 bolnikov indukcijsko zdravljenje zaključilo, dva bolnika še prejemata indukcijsko zdravljenje. Povprečno so bolniki prejeli 1,5 krogov zdravljenja (1-3). Mediana starost bolnikov ob pričetku zdravljenja je bila 60 (46 – 72) let, zdravili smo 9 moških in 6 žensk. 13 bolnikov je imelo ob postavitvi diagnoze opravljen NGS, kjer je 12 bolnikov imelo klinično pomembne mutacije v genih povezanih z mielodisplastičnimi novotvorbami. Več kot polovica bolnikov (7) je imelo tri ali več mutacij, med katerimi je bila najpogostejša mutacija *RUNX1*. Značilnosti bolnikov, ki so zaključili indukcijsko zdravljenje so predstavljene v *tabeli 1*.

Tabela 1: Klinični podatki bolnikov zdravljenih na KOH UKC LJ 2022-2025.

Spremenljivka	N = 13	%
Starost (mediana)	60 (46-72) let	
Spol		
moški	7	53,8
ženski	6	46,2
Število ciklusov		
1	8	61,5
2	3	23,1
3	2	15,4
Citogenetika		
kompleksen kariotip	4	30,8
NGS (gensko sekvenciranje)		
≥ 3 mutacije	7	53,8
Odgovor na zdravljenje		
CR + CRi	11	84,6

11 bolnikov je po indukcijskem zdravljenju doseglo remisijo (kompletna remisija + kompletna remisija z nepopolno hematološko remisijo). Mediani čas do regeneracije nevtrofilnih granulocitov je bil 28,5 dni (22 – 65, pri enem bolniku ni prišlo do regeneracije), do regeneracije trombocitov 24 dni (21 – 143, pri enem bolniku ni prišlo do regeneracije). Najpogostejši zaplet zdravljenja je bila febrilna nevtropenija, ki pri dveh bolnikih ni dovoljevala nadaljevanja zdravljenja. Šest bolnikov je manj kot šest mesecev od začetka zdravljenja, zato je v analizo vključenih sedem bolnikov. Vseh sedem bolnikov je preživel več kot 6 mesecev od začetka zdravljenja, štirje bolniki so živeli več kot 2 leti. Od sedmih bolnikov so štirje bolniki zdravljenje nadaljevali z aloPKMC. Vsi bolniki zdravljeni z aloPKMC so preživel več kot 6 mesecev, 75 % bolnikov je preživel več kot 2 leti. Povprečno preživetje bolnikov zdravljenih z aloPKMC je 18,7

mesecev, brez aloPKMC pa 12,7 mesecev. Pri vseh bolnikih po aloPKMC je bil vzrok smrti težka oblika reakcije presadka proti gostitelju (GVHD), pri bolnikih, ki niso bili zdravljeni z aloPKMC pa progres AML.



Graf 1. Pogostost in vrsta mutacij.

Zaključek

Naši podatki in podatki iz kliničnih študij nakazujejo, da CPX-351 predstavlja učinkovito indukcijsko zdravljenje AML-MRC in t-AML. Ker gre za starejšo populacijo bolnikov, je kljub temu potrebno razmisliti o individualiziranem pristopu z uporabo manj intenzivnih protokolov indukcijskega zdravljenja, optimizaciji podpornega zdravljenja in obvladovanja GVHD pri bolnikih, ki so kandidati za aloPKMC. Največjo dolgoročno dobrobit imajo namreč ravno bolniki, ki so bili zdravljeni s postopkom aloPKMC, ne glede na indukcijsko zdravljenje. Za potrditev dolgoročnih koristi zdravljenja s CPX-351 bodo potrebne dodatne analize in randomizirane klinične študije na večjem vzorcu in z daljšim časom spremljanja.

Literatura

1. Green SD, Wang ES. How I treat: secondary acute myeloid leukemia. *Blood*. 2024;145(12):1260–72.
2. Lancet JE, Uy GL, Newell LF, Lin TL, Ritchie EK, Stuart RK, et al. CPX-351 versus 7+3 cytarabine and daunorubicin chemotherapy in older adults with newly diagnosed high-risk or secondary acute myeloid leukaemia: 5-year results of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2021;8(7):e481–91.
3. Cluzeau T, Guolo F, Chiche E, Minetto P, Rahme R, Bertoli S, et al. Long-term real-world evidence of CPX-351 of high-risk patients with AML identified high rate of negative MRD and prolonged OS. *Blood Adv*. 2025;9(4):752–8.
4. Winters AC, Bosma G, Abbott D, Minhajuddin M, Jordan C, Pollyea DA, et al. Outcomes Are Similar After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Patients who Received Venetoclax + Azacitidine Versus Intensive Chemotherapy. *Transplant Cell Ther*. 2022;28(10):694.e1-694.e9.
5. Matthews AH, Perl AE, Luger SM, Loren AW, Gill SI, Porter DL, et al. Real-world effectiveness of CPX-351 vs venetoclax and azacitidine in acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2022;6(13):3997–4005.

Limfoproliferativne bolezni (ZHS)

Zdravljenje dlakastocelične levkemije- mesto konsolidacije in BRAF zaviralcev

Jasmina Hauptman¹, Andraž Dobnik²

1 Univerzitetni klinični center Maribor, 2 Univerzitetni klinični center Ljubljana

jasmina.hauptmanfaletic@ukc-mb.si

Uvod

Dlakastocelična levkemija (DCL) je redka, kronična B-celična limfoproliferativna bolezen, za katero je značilna visoka prevalenca BRAF mutacije (>90 %). Le ta vodi v RAS- neodvisno aktivacijo MAP kinazne poti, ki povzroča hiperaktivacijo ERK kinaze, ki omogoča proliferacijo ter preživetje dlakastih celic.

Purinski analogi (PA; kladribin, pentostatin) že zadnjih 20 - 30 let predstavljajo osnovo zdravljenja bolezni v prvih linijah ter omogočajo doseganje trajne remisije bolezni pri 80% - 90% bolnikov. Kljub vsemu pa ostaja bolezen neozdravljiva ter 58% bolnikov, ki dosežejo popolno remisijo po prvem zdravljenju, doživi ponovitev znotraj 5 let po doseženi remisiji. Smernice zdravljenja priporočajo ponovitev terapije s purinskimi analogi v primeru trajanja predhodne remisije vsaj 24 mesecev oz. dodatek rituksimaba v primeru krajšega trajanja.

Konsolidacijska terapija ter BRAF inhibitorji

Dodatek rituksimaba, kot konsolidacijska terapija k osnovni terapiji (PA), poglobi odgovor na terapijo ter vodi v dolgotrajno remisijo. V prospektivni študiji faze 2, opravljeni s strani Ravandi in ostalih, so bolniki v sklopu 1 linije terapije prejeli 5 dnevni cikel s kladribinom (0,15 mg/kg) ter nato po 1 mesecu dodatno 8 tedenskih aplikacij rituksimaba. Pri vseh 59 bolnikih so po terapiji ugotovili doseganje kompletnega odgovora (CR), brez zabeleženih stranskih učinkov gradusa 3 ali 4. Pet letno preživetje brez napredovanja bolezni (PFS) ter celokupno preživetje je znašalo 95% ter 97%.

Dodatna študija faze 2 je primerjala terapijo s kladribinom z dodatkom 8 tedenskih odmerkov rituksimaba od prvega dne terapije, s kladribinom v monoterapiji ter dodatkom rituksimaba 6

mesecev po začetku osnovne terapije v primeru MRD pozitivnosti bolnika. 62 % bolnikov v skupini s kombinacijsko terapijo od prvega dneva v primerjavi z 9 % z monoterapijo je doseglo MRD negativno kompletno remisijo po 4 tednih terapije. Po 6 mesecih od prejete terapije je kompletno remisijo doseglo 100 % vs. 88 % ter MRD neg CR 97 % vs. 24 % bolnikov v obeh skupinah. Po prejemu odložene terapije z rituksimabom v drugi skupini (21/34 bolnikov) se je MRD negativnost pri bolnikih zvišala na 68 %. Po 96 mesečnem spremljanju obeh skupin je vztrajala MRD negativnost pri 94 % bolnikov s kombinacijsko terapijo vs. 47 % v skupini z odloženo terapijo z rituksimabom. Ob sočasni uporabi zdravil pa je potrebno razmisliti tudi o večji toksičnosti. Trombocitopenija gradusa 3 ali 4, ki je potrebovala transfuzijo se je pojavila pri 35 % bolnikov s kombinacijsko terapijo, medtem ko takšnega neželenega sopojava pri zakasnelem rituksimabu niso beležili.

V zadnjem desetletju je bil narejen velik napredek na področju zdravljenja refraktarne/ponovljene DCL z uporabo moksetumumaba pasudotoxina (Moxe) in BRAF inhibitorjev. V študiji faze 2 z BRAF zaviralcem vemurafenibom v monoterapiji (vemurafenib 960 mg 2x/dan) je bil dosežen celokupen odgovor pri 91 % bolnikov v 2 – 3 mesecih, z doseganjem 35 % kompletne remisije. Kljub terapiji so bile pogoste ponovitve bolezni s povprečnim časom do napredovanja bolezni 19 mesecev pri bolnikih z doseženo kompletno remisijo ter 6 mesecev pri bolnikih z delno remisijo bolezni. Stranski učinki, ki so bili v celoti reverzibilni ter so dosegali gradus 1 – 2, so bile različne kožne manifestacije (fotosenzitivnost, izpuščaji, alopecija, palmarna hiperkeratoza, bradavice), artralgie ali artritis (odziven na nizke odmerke steroidov), povišana telesna temperatura, povišane vrednosti serumskega bilirubina ter lipaze, kar je vodilo v zmanjšanje odmerka tekom zdravljenja pri 50 % – 58 % bolnikov.

Kombinacijska terapija vemurafeniba z dodatkom CD20 monoklonskega protitelesa rituksimaba lahko uniči še preostale celice, ki so rezistentne na BRAF inhibitor. V študiji faze 2 so ugotovili doseganje kompletne remisije pri več kot 87 % bolnikov (35 % pri monoterapiji). Prav tako je bil čas do dosežene CR veliko krajši (16 vs. 8 tednov), 65 % bolnikov z doseženo CR je bilo ob kontroli MRD negativnih (vsi MRD poz v skupini z monoterapijo). PFS (RFS) ob 34 mesecih je znašal 85 %.

Vemurafenib v kombinaciji z rituksimabom predstavlja varen, kratkotrajen ter ne mielotoksičen način zdravljenja bolnikov, ki omogoča doseganje globokega ter trajnega odgovora pri bolnikih z rezistentno/refraktarno obliko bolezni.

Prospektivna klinična študija faze 2 (EudraCT-2014-001379-29) je ocenjevala učinkovitost ter varnost terapije z dabrafenibom (150 mg /12 ur 8 -12 tednov). Ugotavljali so 80 % celokupen odgovor na terapijo s 30 % kompletno ter 50 % delno remisijo ter celokupno preživetje bolnikov 90 % pri 64 mesecih.

V nerandomizirani študiji faze 2 so bolniki s ponovljeno/refraktarno DCL z dokazano BRAF mutacijo prejeli terapijo z dabrafenibom (150 mg na 12 ur) v kombinaciji z MEK inhibitorjem trametinibom (2 mg). Ugotavljali so celokupen odgovor v 89 % z doseženo 65 % kompletno remisijo. Preživetje brez napredovanja bolezni ter celokupno preživetje pri 24 mesecih je bilo ocenjeno na >90 %.

Zaključek

Bodoča prizadevanja v terapiji dlakastocelične levkemije bi morala biti usmerjena k doseganju čim večje MRD negativnosti, saj le-to dokazano lahko prepreči ponovitev oziroma podaljša čas do ponovitve bolezni ter nadaljnje terapije.

Priporočljivo je konsolidacijsko zdravljenje z rituksimabom po indukciji s kladribinom za doseganje globoke remisije. BRAF inhibitorji bodo v prihodnje igrali ključno vlogo pri zdravljenju relapsa oziroma rezistentne bolezni, zlasti v kombinaciji z anti-CD20 protitelesom.

Literatura

1. Ravandi F, O'Brien S, Jorgensen J, et al. Phase 2 study of cladribine followed by rituximab in patients with hairy cell leukemia. *Blood* 2011; 118:3818
1. Chihara D, Arons E et al. Randomized Phase II Study of First-Line Cladribine With Concurrent or Delayed Rituximab in Patients With Hairy Cell Leukemia. *J Clin Oncol.* 2020 May 10;38(14):1527-15383. Tiaci E, Park JH, De Carolis L, Chung SS, Broccoli A et

- al. Targeting Mutant BRAF in Relapsed or Refractory Hairy-Cell Leukemia. *N Engl J Med*. 2015 Oct 29;373(18):1733-47.
2. Robert J. Kreitman et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with relapsed/refractory BRAF V600E mutation–positive hairy cell leukemia. *Blood* 2023; 141(9): 996–1006
 3. Falini B, Tiacci E. New treatment options in hairy cell leukemia with focus on BRAF inhibitors. *Hematological Oncology*. 2019;37(S1):30–37.
 4. Brunangelo Falini, Luca De Carolis, Enrico Tiacci, How I treat refractory/relapsed hairy cell leukemia with BRAF inhibitors, *Blood*, Volume 139, Issue 15, 2022, Pages 2294-2305,
 5. Tiacci E, De Carolis L, Simonetti E, Merluzzi M, Bennati A, Perriello VM, Pucciarini A, Santi A, Venanzi A, Pettirossi V, Schiavoni G, Tasselli L, Ascani S, Volpetti S, Falini B. Safety and efficacy of the BRAF inhibitor dabrafenib in relapsed or refractory hairy cell leukemia: a pilot phase-2 clinical trial. *Leukemia*. 2021 Nov;35(11):3314-3318.

Diagnostika in zdravljenje levkemije velikih granuliranih limfocitov

Irena Bricman¹, Matija Rozman²

1 Splošna bolnišnica Slovenj Gradec, 2 Univerzitetni klinični center Ljubljana

irena.bricman@sb-sg.si

Levkemija velikih granuliranih limfocitov (T/NK large granular lymphocytic (LGL) leukemia) je redko, manj maligno limfoproliferativno obolenje, ki ga zaznamuje vsaj šest mesečna klonalna razrast velikih zrelih T- ali NK celic (zgodovinski kriterij $> 2 \times 10^9/L$; sedaj splošno sprejet prag $> 0,5 \times 10^9/l$).

Po klasifikaciji WHO-HAEM5, ki zrele T celične in NK neoplazme razvršča v 9 posameznih skupin, je znotraj teh ena skupina namenjena zrelim T/NK celičnim (levkemiziranim) limfomom kamor sodi 6 entitet – T-LGL levkemija, NK-LGL levkemija, agresivna NK celična levkemija (ANKL), T-prolimfocitna levkemija (T-PLL), Sezaryjev sindrom in odrasla T celična levkemija/limfom (ATLL; adult T cell leukemia/lymphoma).

Povprečna starost obolelih je 66 let, incidenca je enaka pri moških in ženskah, vendar se pri njih diagnoza pogosto postavi pri nekoliko mlajših, kot je povprečna starost. Kljub svojemu indolentnem poteku je levkemija LGL povezana z medianim celokupnim preživetjem vsaj 9 do 10 let. Z boleznijo povezane smrti so večinoma posledica hudih okužb v obdobju nevtropenije; te se pojavijo vsaj pri 10 % bolnikov. LGL levkemija predstavlja 2 do 5 % limfoproliferativnih obolenj v Severni Ameriki in Evropi in 5 % do 6 % v Aziji.

Etiologija bolezni je še vedno neznana. Izpostavljenost določenemu antigenu naj bi vodila v disregulacijo apoptoze limfocitov T/ NK celic preko disregulacije JAK/STAT signalne poti. Konstitutivna aktivacija STAT3 signalne poti je povezana s pridobljeno mutacijo STAT3 gena (signal transducer and activator of transcription 3), ki je prisotna pri 30-40% bolnikov (predvsem pri podtipu CD8+ T-LGL levkemiji). Mutacija STAT5b gena (signal transducer and activator of transcription 5B) je veliko redkejša, vendar jo pogosteje najdemo pri redki podskupini bolezni s fenotipom CD4+ T-LGL levkemiji (če najdemo pri CD8+ T-LGL je po nekaterih podatkih povezano s

slabo prognozo zaradi rezistentne bolezni). Vlogo pri nastanku bi lahko imelo tudi nekoliko bolj pro-vnetno mikrookolje kostnega mozga predvsem relativni presežek citokinov IL-6, IL-12, IL-15, macrophage inflammatory protein 1 (MIP-1), in RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted), PDGF in drugih, v sklopu kroničnih okužb, revmatskih ali drugih obolenj. LGL celice so nekoliko večje kot tipični cirkulirajoči limfociti (velikosti ranga 15–18 µm z bogato citoplazmo in ledvičastim zrelim jedrom) in vsebujejo tipične azurofilne granule, vsebina katerih so encimi kislih hidrolaz. V običajnih razmerah predstavljajo LGL celice 10-15% vseh limfocitov in ne presegajo 0,25 x 10⁹/l. Celice LGL izhajajo iz dveh linij - 85% pripada liniji citotoksičnih T limfocitov z imunofenotipom CD3+, CD8+, CD16+, CD57+, CD45RA+, TCRab+, in CD4-, CD56-, CD27-, CD45RO-, CD28-, CD62L-, CD5dim in/ali CD7dim ob tem prisotna klonalnost T celičnega receptorja s preureditvijo v genih za TCR alfa/beta verigo (večina primerov; 10% TCR gama/delta); v zelo redkih primerih ima T-LGL levkemija fenotip CD4+ pomagalk; ostalih 15% pripada NK celicam z imunofenotipom CD2+, CD3-, CD3ε+, TCRab-, CD4-, CD8+, CD16+, CD56+, CD57+/- (NK celice brez TCR; določanje KIR receptorjev oz. dokaz CD158). Pri določenih reaktivnih stanjih (okužba s HIV, CMV, EBV, HBV, HCV, pri hemofagocitem sindromu, pri solidnih tumorjih, po splenektomiji) lahko prehodno zaznamo populacijo T/NK celic, vendar bo pri teh populacijah celic test za določanje T celične klonalnosti negativen.

V sklopu diagnostike punkcija in biopsija kostnega mozga načeloma nista nujno potrebni, v kolikor se bolezensko stanje opredeli že iz morfologije, pretočne citometrije in določanja T celične klonalnosti iz periferne krvi. Preiskave kostnega mozga so sicer koristne pri opredelitvi citopenij s katerimi se običajno bolezen prezentira (predvsem nevtropenija). Za LGL levkemijo naj bi bil značilen sicer nekoliko hipercelularni kostni mozeg glede na starost bolnika z relativno nizko intersticijsko/intrasinusoidno infiltracijo (do 50 %) z LGL celicami (pomen imunohistokemičnega barvanja).

Proliferacija celic vodi do infiltracije periferne krvi in/ali kostnega mozga in posledičnega pojava citopenij - predvsem nevtropenije (značilna za >80% obolelih; glavni vzrok za morbiditeto in mortaliteto); anemija pri 40%, trombocitopenija pri 20% in limfocitoza pri 50% bolnikov.

B simptomatika je v sklopu bolezni redka (zgolj v 10-20 %); tretjina je popolnoma asimptomatska. Četrtna bolnikov ima splenomegalijo in/ali hepatomegalija; periferna limfadenopatija je redka. Lahko so prisotni tudi avtoimunski fenomeni v sklopu spremljajočega avtoimunskega obolenja (15-40% - revmatoidni artritis (RA), sistemski eritematozni lupus, Sjögrenov sindrom, avtoimunske bolezni ščitnice, miozitis z inkluzijskimi telesci, krioglobulinemični vaskulitis in ostali vaskulitisi, celiakija, polimiozitis, KVČB, endokrinopatije in še redkeje druge hematološke novotvorbe);

- Nevtropenija (80% bolnikov, 45% huda nevtropenija). Najpogostejša citopenija, do katere pride zaradi zvišanih nivojev Fas-L liganda, ki vodi do neposredne apoptoze nevtrofilcev, in TNF- α in INF- γ , ki zavirata nastanek nevtrofilcev in aktivirata apoptozo.
- PRCA (8–19% bolnikov); etiologija povezana z nastajanjem provnetnih citokinov, preko katerih pride do zavore eritroidnih prekurzorjev. Pogosteje pri Azijcih.
- AIHA (10-15% bolnikov); disregulacija v nastanku (avto) protiteles.
- Revmatoidni artritis (RA) in T-LGL levkemija - pogosta in znana povezava. Obstajajo zgolj domneve glede etiologije - RA kot paraneoplastični fenomen T-LGL levkemije; ali druga pot preko nastanka neo(avto)antigenov ob propadu nevtrofilcev kar vodi do razvoja RA in nato zaradi stalne in prekomerne znotrajcelične aktivacije signalnih poti še do monoklonske proliferacije T celic.

Zdravljenje

Osnova zdravljenja je imunosupresivna terapija (IS). Podatki o učinkovitosti IS so sicer pridobljeni iz retrospektivnih študij, saj zaradi redkosti bolezni ni večjih aktualnih prospektivnih primerjalnih kliničnih študij. T-LGL levkemija in NK-LGL levkemija se zdravita po enakih principih.

Indikacije za zdravljenje so: huda nevtropenija (absolutno število nevtrofilcev $< 0,5 \times 10^9/l$), zmerna nevtropenija (absolutno število nevtrofilcev $0,5 \times 10^9/l$ do $1 \times 10^9/l$) in z njo povezane ponavljajoče se okužbe; simptomi anemije ali transfuzijska odvisnost; kombinirane bi/citopenije; in druga sočasna avtoimunska stanja, ki zahtevajo zdravljenje.

Prva linija temelji na peroralni IS: metotreksat (MTX 10 mg/m² na 1x teden), ciklofosamid (CTX 50-100 mg/dan) ali ciklosporin A (CsA 3-5 mg/kg na dan; samostojno ali skupaj z MTX).

Odgovor na zdravljenje je počasen, po nekaterih podatkih je potrebno vsaj 4 mesece aktivno zdraviti do prve ocene učinkovitosti zdravljenja (kriteriji za hematološki odgovor: Hb ≥ 120 g/L; Tr $\geq 150 \times 10^9$ /L; nevtrofilci $\geq 1.5 \times 10^9$ /L in limfociti $\leq 4 \times 10^9$ /L).

Ob prizadetosti rdeče vrste je priporočljiva uporaba CTX ali CsA, MTX je primernejši za nevtropenijo in/ali sočasni RA. Kratkotrajna sočasna terapija s steroidom v standardnih odmerkih (nekateri uporabljajo pri nevtropeniji $< 0,2 \times 10^9$ /L metilprednizolon v padajočih odmerkih 1 do maksimalno 2 meseca) ali souporaba G-CSF (ima učinek na hitro rast vranice) lahko prideta v poštev pri citopenijah, vse dokler ne pride do uspešne supresije T-celičnega kлона. Sama učinkovitost monoterapije s steroidom je nizka.

MTX (hepatopatija in hipersenzitivni pnevmonitis) in CsA (ledvična funkcija, elektrolitski disbalans in krvni tlak) se lahko uporabljata daljše obdobje, CTX se ukine po 8-12 mesecih (sekundarni solidni karcinomi, MDS). Analize globokega sekvenciranja ostankov klonov LGL razkrivajo, da se lahko s CTX izkorenini tleče klone LGL, kar zagotavlja trajen odziv, medtem ko sta zdravljenje z MTX in CsA povezana z veliko večjo verjetnostjo za trajni obstoj levkemičnih klonov.

Večja učinkovitost MTX naj bi bila pri prisotni STAT3 mutaciji (preko inhibicije JAK/STAT signalizacije vpliva na protivnetno in imunosupresijsko delovanje na nivoju T celične aktivacije). Glede na podatke iz novejših študij znaša popolni odgovor na zdravljenje (CRR $< 20\%$); ORR za MTX znaša 38 to 56%, CRR 16% - 21%, za CTX ORR (62%) in CRR (32%), CsA hematološki odgovor v 45-56% (učinkovitost povezujejo z HLA-DR4). Sicer se dokončni podatki o učinkovitosti posameznih učinkovin razlikujejo med različnimi avtorji študij. Refraktarnost bolezni ni redka.

Druga linija vključuje uporabo sirolimusa, alemtuzumaba (anti-CD52; ORR 56 %; doziranje 10 mg 1–2/teden s.c.), ATG, rituximab (ob sočasnem RA, sicer zelo redko odziv), analogi purina (fludarabin, kladribin, bendamustin; ORR 79%), splenektomija (ORR 56%; pri splenomegaliji). Nekateri se poslužujejo JAK inhibitorjev (ruxolitinib, tofacitinib JAK3 inhibitor), IL-6 antagonistov in proteosomskih inhibitorjev (bortezomib, ixazomib), siplizumaba (anti-CD2), silituximaba (preprečuje vezavo IL-6 na receptor) in drugih eksperimentalnih učinkovin.

Literatura

1. Ullah F, Markouli M, Orland M, Ogbue O, Dima D, Omar N, Mustafa Ali MK. Large Granular Lymphocytic Leukemia: Clinical Features, Molecular Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. *Cancers (Basel)*. 2024 Mar 27;16(7):1307.
2. Fox CP, Ahearne MJ, Pettengell R, Dearden C, El-Sharkawi D, Kassam S, Cook L, Cwynarski K, Illidge T, Collins G. Guidelines for the management of mature T- and natural killer-cell lymphomas (excluding cutaneous T-cell lymphoma): a British Society for Haematology Guideline. *Br J Haematol*. 2022 Feb;196(3):507-522.
3. Lamy T, Moignet A, Loughran TP Jr. LGL leukemia: from pathogenesis to treatment. *Blood*. 2017 Mar 2;129(9):1082-1094.
4. Park SH, Lee YJ, Kim Y, Kim HK, Lim JH, Jo JC. T-large granular lymphocytic leukemia. *Blood Res*. 2023 Apr 30;58(S1):S52-S57.
5. Schreiber J, Pichler A, Kornauth C, Kaufmann H, Staber PB, Hopfinger G. T-Cell Large Granular Lymphocyte Leukemia: An Interdisciplinary Issue? *Front Oncol*. 2022 Feb 10;12:805449.
6. Lamy T, Loughran TP Jr. How I treat LGL leukemia. *Blood*. 2011 Mar 10;117(10):2764-74. doi: 10.1182/blood-2010-07-296962. Epub 2010 Dec 29. Erratum in: *Blood*. 2014 Mar 27;123(13):1182.
7. Moignet A, Lamy T. Latest Advances in the Diagnosis and Treatment of Large Granular Lymphocytic Leukemia. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2018 May 23;38:616-625

Centralna prizadetost ob kronični limfocitni levkemiji

Nejc Pulko¹, Barbara Skopec²

1 Univerzitetni klinični center Maribor, 2 Univerzitetni klinični center Ljubljana

nejc.pulko@kclj.si

Uvod

Za kronično limfocitno levkemijo (KLL) je značilno kopičenje zrelih klonalnih B limfocitov. Večino bolnikov odkrijemo naključno, potek bolezni je običajno počasen z dolgim pričakovanim preživetjem. Ob progresu bolezni se klonalni limfociti lahko kopičijo v bezgavkah, vranici, jetrih in kostnem mozgu. Redkeje prizadenejo tudi druge organe, kot so koža, ledvice in prebavni trakt. Prizadetost centralnega živčnega sistema (CŽS) je pri KLL redka. Študija 4174 bolnikov je pokazala, da je incidenca prizadetosti CŽS 0,4 %. Trenutno ni dokazanih dejavnikov tveganja, ki bi jih lahko povezali z večjo verjetnostjo prizadetosti CŽS. Njena pojavnost ni pogostejša pri bolnikih s prisotno mutacijo TP53 ali kompleksno citogenetiko.

Prikaz primera

Decembra 2021 je bil takrat 71-letni bolnik napoten v hematološko ambulantno UKC Ljubljana zaradi naključno ugotovljene levkocitoze. V preteklosti se je zdravil zaradi bazalnoceličnega karcinoma na levi goleni, imel je znano arterijsko hipertenzijo in hiperlipidemijo. Bolnik je bil asimptomatski. S kliničnim pregledom nismo ugotovili povečanih bezgavk, jeter ali vranice. V krvni sliki smo zabeležili $18,77 \times 10^9/\text{L}$ levkocitov, od tega $12,53 \times 10^9/\text{L}$ limfocitov, vrednosti hemoglobina in trombocitov so bile normalne. S pretočno citometrijo smo dokazali KLL. Bolnika smo redno spremljali v hematološki ambulanti.

Septembra 2024 so se nenadoma pojavile težave z nestabilno hojo, ki so se stopnjevale. Potreboval je oporo, nato so se pojavile tudi težave z motoriko leve roke. Ambulantno je opravil MR glave, kjer je bila vidna tumorska lezija leve cerebelarne hemisfere velikosti $4,5 \times 2,8$ cm, v

kavdalnem delu pa nakazano 1,8 cm veliko hipointenzivno področje, verjetno edem. Četrty ventrikel je bil utesnjen. Bolnik je bil sprejet na Nevrološko kliniko UKC Ljubljana. V krvni sliki je bila prisotna levkocitoza ($91,78 \times 10^9/L$) z limfocitozo ($84,20 \times 10^9/L$), vrednosti hemoglobina in trombocitov so bile normalne. S citologijo in pretočno citometrijo vzorca likvorja so ugotovili prisotnost KLL v likvorju. Predstavili so ga na limfomskem konziliju Onkološkega inštituta (OI), kjer so za dokončno postavitev diagnoze svetovali biopsijo spremembe v CŽS. Opravljene so bile molekularno-genetske preiskave, ki so pokazale prisotnost IGHV mutacije in odsotnost TP53. Pred biopsijo lezije v CŽS so ga pričeli zdraviti z zaviralci Brutonove tirozin kinaze (BTKi) zanubrutinibom. Novembra 2024 je pred predvideno nevrokirurško biopsijo opravil kontrolni MR glave, ki je pokazal regresijo spremembe cerebelarno zato, ob tveganju za zaplete, biopsije niso naredili. Bolnik je sicer že prvi teden po uvedbi zanubrutiniba navajal izboljšanje počutja, ponovno je bil samostojen pri dnevni aktivnostih. Naslednja dva meseca je bilo klinično stanje stabilno.

Ob kontrolnem pregledu v hematološki ambulanti napotili na kontrolni MR glave, ki ga je opravil februarja 2025. Tam so opisali dve novonastali leziji – eno v dorzalnem delu korpusa calosuma, drugo subkortikalno desno parietalno z obsežnim področjem edema možganovine. Nekaj dni po opravljenem kontrolnem MR glave se je klinično stanje bolnika ponovno izrazito poslabšalo, ni bil zmožen samostojne hoje. Ob pregledu v nujni nevrolški ambulanti so ugotovili levostransko hemianopsijo in hemiparezo, potrebova je sprejem v bolnišnico. Limfomski konzilij OI je ponovno svetoval biopsijo sprememb v CŽS, ki so jo nato opravili. Patohistološki izvid je bil skladen z difuznim velikoceličnim B limfomom. Zaradi slabega splošnega stanja bolnika so ga na OI zdravili le s paliativnim obsevanjem sprememb v CŽS.

Prizadetost CŽS pri KLL

Na KLL s prizadetostjo CŽS posumimo na podlagi klinične slike, slikovnih preiskav in lumbalne punkcije, dokončno diagnozo postavimo s histološkim dokazom. Pri bolnikih se lahko pojavijo motorične motnje, zmedenost, optična nevropatija, znaki prizadetosti malih možganov, glavobol ali vročina. Tipične spremembe na MR glave so difuzna zadebelitev možganskih ovojníc,

infiltracija parenhima in nodularne spremembe. Presentacija s tumorsko spremembo je pri KLL redka. Obdukcije bolnikov s KLL so pokazale prisotnost infiltracije CŽS tudi pri nekaterih bolnikih, ki niso imeli kliničnih znakov nevrološke prizadetosti. Asimptomatska infiltracija CŽS naj bi bila prisotna pri 8–10 % vseh bolnikov s KLL. Ob lumbalni punkciji moramo odvzeti vzorec za citološke preiskave, imunofenotipizacijo in biokemijske preiskave. Pri preiskavi lahko pride do kontaminacije vzorca s periferno krvjo, kar lahko privede do napačne diagnoze.

Trenutno smernic zdravljenja KLL s prizadetostjo CŽS nimamo. Opisani so številni primeri zdravljenja z imunokemoterapijo (rituksimab, fludarabin in ciklofosamid) ter tarčno terapijo z BTKi, fosfatidilinozitol 3-kinaznimi (PI3K) inhibitorji in BCL-2 inhibitorji. BTKi dokazano prehajajo krvno-možgansko pregrado, saj je ibrutinib s strani FDA (angl. Food and Drug Administration) registriran v prvi liniji zdravljenja primarnih limfomov CŽS.

Prognosa KLL s prizadetostjo CŽS je odvisna od osnovne stopnje bolezni. Retrospektivna študija 30 bolnikov je pokazala celokupno 5-letno preživetje 72 %. V kolikor se prizadetost CŽS pojavi ob sočasnem napredovanju bolezni, je celokupno 5-letno preživetje manj kot 50 %. Pri 2–10 % bolnikov lahko bolezen napreduje z Richterjevo transformacijo, ki vodi v preoblikovanje v difuzni velikocelični B limfom, Hodgkinov limfom ali plazmoblastni limfom. Prognosa teh bolnikov je slaba. Dejavniki tveganja za razvoj Richterjeve transformacije prav tako niso poznani. Nekoliko pogostejša je pri bolnikih s prisotno mutacijo TP53, MYC in nemutiranim IGHV statusom.

Zaključek

Prizadetost CŽS je pri bolnikih s KLL izjemno redka. Zgodnje prepoznavanje in zdravljenje sta ključna za izboljšanje preživetja in kakovosti življenja bolnikov. Ob lumbalni punkciji lahko pride do kontaminacije vzorca, zato je za dokončno postavitve diagnoze ključna pridobitev histološkega vzorca.

Literatura

1. Qin LY, Geng Y, Mu JF, Wang WJ, Zhang CX, et al. Central nervous system involvement in chronic lymphocytic leukemia: a case report and review of literature. *J Med Case Rep.* 2024;18(1):315.
2. Strati P, Uhm JH, Kaufmann TJ, Nabhan C, Parikh SA, Hanson CA, et al. Prevalence and characteristics of central nervous system involvement by chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2016;101(4):458-65.
3. Wanquet A, Birsén R, Bonnet C, Boubaya M, Choquet S, et al. Management of central nervous system involvement in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective cohort of 30 patients. *Br J Haematol.* 2017;176(1):37-49.
4. Hanse MC, Van't Veer MB, van Lom K, van den Bent MJ. Incidence of central nervous system involvement in chronic lymphocytic leukemia and outcome to treatment. *J Neurol.* 2008;255(6):828-30.
5. Mihaljevic B, Smiljanic M, Antic D, Kurtovic NK, Balint MT. Chronic Lymphocytic Leukemia Involvement of Central Nervous System: Clinical Diversity, Diagnostic Algorithm and Therapeutic Challenges. *Ann Indian Acad Neurol.* 2018;21(1):85-7.

Bing-Neel sindrom

Tajda Starman, Matevž Škerget

Univerzitetni klinični center Ljubljana

tajda.starman@kclj.si

Uvod

Bing-Neel sindrom (BNS) je zelo redka ekstramedularna prezentacija Waldenströmove makroglobulinemije (WM), pri kateri gre za infiltracijo centralnega živčnega sistema z limfoplazmicitnim limfomom. Klinična slika je lahko zelo raznolika (glavobol, motnje vida in sluha, kognitivni upad, pareza, psihiatrični simptomi, težave s hojo, motnja zavesti), zato je pri bolnikih z znano WM in nepojasnenimi nevrološkimi težavami potrebno pomisliti na BNS. Poleg tega je diferencialno diagnostično potrebno upoštevati možen hiperviskozni sindrom in z IgM povzročeno periferno polinevropatijo (lahko s pozitivnimi anti-MAG protitelesi). BNS se lahko pojavi pri bolnikih z do sedaj neznano WM, pogosteje pa pri bolnikih z že postavljeno diagnozo bolezni, ki pa je lahko brez drugih sistemskih znakov.

Klinični primer

69-letni moški je prvi pregled v hematološki ambulanti opravil marca 2023 zaradi naključno ugotovljenega monoklonskega zobca. Ob pregledu je navajal občasno nočno potenje, drugih težav ni imel. Zdravil se je zaradi atrijske fibrilacije ter prejemal rivaroksaban in bisoprolol. Alergij in razvad ni navajal. Krvna slika je bila v mejah normale, v serumu pa smo ugotovili monoklonski zobec IgM lambda velikosti 6 g/L. Odločili smo se za spremljanje bolnika, ki na kontroli čez 6 mesecev prav tako ni navajal večjih težav. Decembra 2023 je bil ob disfaziji postavljen sum na ishemično možgansko kap, ki pa s CT preiskavo možganov ni bila dokazana. Poleg disfazije se je pojavila še encefalopatija. Opravili so lumbalno punkcijo, ki je pokazala limfocitno pleocitozo in nižjo glukozo. Zaradi suma na herpetični encefalitis so mu uvedli zdravljenje z aciklovirjem. Vse odvzete kužnine, vključno z nevrotropnimi virusi, so bile negativne, prav tako so bila negativna paraneoplastična protitelesa, markerji demence in oligoklonalni trakovi v serumu. V

laboratorijskih izvidih so ugotavljali bicitopenijo, zaradi česar so opravili preiskave kostnega mozga, ki so pokazale infiltracijo kostnega mozga z drobnoceličnim B celičnim limfomom ter proliferacijo plazmatk z aberantnim fenotipom, ki izraža restrikcijo na lambda lahke verige, z molekularno genetskimi preiskavami so potrdili prisotnost mutacije gena MYD88. Ponovljena lumbalna punkcija je pokazala prisotnost monoklonskih B celic z imunofenotipom kronične limfocitne levkemije B, molekularno genetske preiskave niso bile izvedene. MR preiskava možganov je pokazala nespecifične FLAIR hiperintenzivnosti periventrikularno ob stranskih ventriklih, kar so pripisali kronični vaskularni levkopatiji. Tekom hospitalizacije je prišlo do delnega izboljšanja klinične slike.

5.1.2024 smo pričeli zdravljenje z akalabrutinib 2 x 100 mg dnevno, po čemer je prišlo do popolnega izzvenetja simptomov.

Diagnostika

Pri diagnostiki BNS si pomagamo s slikovnimi preiskavami - MR glave in hrbtenjače, lumbalno punkcijo oz. po možnosti biopsijo možganovine. MR nam pomaga izključiti drugo dogajanje v možganovini, poleg tega pa opredeliti primerno mesto za biopsijo. Svetuje se, da se slikovne preiskave opravi pred lumbalno punkcijo. Poudariti je potrebno, da so na MR spremembe na sekvencah T1 in FLAIR vidne v 80 %, in sicer največkrat kot difuzno poudarjene leptomeninge. Pri BNS lahko limfoplazmatske celice zaznamo v likvorju, meningah ali možganskem parenhimu.

Diagnostično je zanesljiva biopsija možganovine, ki se pa zaradi tveganja posega pogosto ne opravi. V primeru, da biopsije ni možno izvesti, je potrebno opraviti lumbalno punkcijo, s katero prav tako iščemo prisotnost limfoma. Za ustrezno diagnostiko moramo opraviti citološko oceno, biokemijske preiskave (značilno prisotna limfocitna pleocitoza in zvišani proteini), imunofenotipizacijo in molekularno diagnostiko.

Klonalne B celice v likvorju morajo imeti enak imunofenotip kot tiste v kostnem mozgu, potrebna pa je pazljivost pri odvzemu zaradi možne kontaminacije likvorja. S pretočno citometrijo dokažemo značilne B-celične markerje (CD19 in CD20), plazmacelične markerje (CD138 in gM) ter restrikcijo lahkih verig. Z molekularnimi preiskavami lahko potrdimo mutacijo gena MYD88, ki je

prisotna v 95 %, potrebno je poudariti, da ne gre za specifično preiskavo, saj je mutacija lahko prisotna tudi pri primarnih limfomih centralnega živčnega sistema in drugih B-celičnih limfomih. V kolikor te še niso bile izvedene, je potrebno opraviti preiskave kostnega mozga za opredelitev WM. Pričakuje se skladnost v imunofenotipu med likvorjem in kostnim mozgom.

Zdravljenje

Zdravljenje je indicirano zgolj pri simptomatskih bolnikih. Cilj je izboljšanje simptomov in podaljšanje preživetja brez napredovanja bolezni. Priporočila za zdravljenje so postavljena na podlagi kliničnih primerov in retrospektivnih analiz, saj prospektivne študije zaradi redkosti bolezni ne obstajajo. Trenutno ima prednost zdravljenje z zaviralci Brutonove tirozinske kinaze (BTKi), v preteklosti pa se je uporabljalo kemoterapevtsko (parenteralno in intratekalno) in radioterapevtsko zdravljenje, redkeje v kombinaciji z monoklonskim protitelesom anti-CD20 ali pa samostojno zdravljenje z avtologno presaditvijo krvotvornih matičnih celic. BTKi so se izkazali za učinkovite pri zdravljenju BNS zaradi svoje zmožnosti prehajanja hematoencefalne bariere, kar je bilo sprva prikazano na kliničnih primerih bolnikov s prizadetostjo centralnega živčevja v sklopu limfoma plaščnih celic, kasneje pa tudi na kliničnih primerih bolnikov z WM in BNS. Opravljena je bila tudi retrospektivna analiza 28 bolnikov z BNS, ki so bili zdravljeni z ibrutinibom v odmerku 420 ali 560 mg enkrat dnevno. Pri 85 % je v 3 mesecih prišlo do izboljšanja simptomatike, pri 60 % pa tudi do radiološkega odgovora. Dveletno preživetje brez dogodkov je bilo 80 %. Glede na rezultate odmerka ibrutiniba ni imel vpliva na izid zdravljenja. Kasneje se je za zdravljenje WM uveljavil tudi BTKi novejša generacija, zanubrutinib, ki je prav tako našel mesto v zdravljenju nekaterih bolnikov z BNS.

Uspešnost zdravljenja ocenjujemo predvsem na podlagi izboljšanja klinične slike, poleg tega pa tudi z oceno likvorja in slikovnimi preiskavami. Popolni odgovor se kaže z normalizacijo klinične slike in likvorja ter odsotnostjo (ali prisotnostjo minimalnih) sprememb na MR. Pri delnem odgovoru pričakujemo izboljšanje simptomov, odsotnost sprememb v likvorju ter vztrajanje radioloških sprememb. Seveda do odgovora na zdravljenje lahko ne pride, v tem primeru vztrajajo ali se slabšajo simptomi, spremembe likvorja ali radiološke spremembe.

Če začnemo zdravljenje z bolj agresivnimi zdravili (kemoterapija) je po dveh ciklih svetovana ocena za morebitni prehod na zdravljenje z BTKi. Pri bolnikih, ki se zdravijo z BTKi je svetovano klinično, laboratorijsko in radiološko spremljanje na 3-4 mesece,

Glede na to, da pri nekaterih bolnikih kljub izzvenetju simptomov vztraja pozitiven likvor, lahko pa zaznamo tudi radiološke spremembe, se zdijo rutinska slikovna diagnostika in lumbalne punkcije manj potrebne oz. so lahko manj pogoste.

Zaključek

BNS je zaradi majhne incidence in neznačilne klinične slike še vedno težko prepoznati. Diagnostika in zdravljenje temeljita na posameznih kliničnih primerih in njihovih analizah. Glavni cilj zdravljenja je izboljšanje simptomatike.

Literatura

1. Minnema MC, Kimby E, D'Sa S, Fornecker LM, Poulain S, Snijders TJ, et al. Guidelines for the diagnosis, treatment and response criteria for Bing-Neel syndrome. *Haematologica*. 2017; 102(1):43-51.
2. Mason C, Savona S, Rini JN, Castillo JJ, Xu L, Hunter ZR, Treon SP, Allen SL. Ibrutinib penetrates the blood brain barrier and shows efficacy in the therapy of Bing Neel syndrome. *Br J Haematol*. 2017 Oct;179(2):339-341.
3. Wong EY, D'Sa S, Minnema MC, Castillo JJ, Talaulikar D. Bing–Neel Syndrome: Update on Diagnosis and Treatment. *Hemato*. 2022; 3(4):758-770.
4. Castillo JJ, Itchaki G, Paludo J, Varettoni M, Buske C, Eyre TA, Treon SP. Ibrutinib for the treatment of Bing-Neel syndrome: A multicenter study. *Blood* 2019, 133, 299–305.

Okužbe pri krvnih boleznih (ZHS)

Bronhoskopija in BAL pri bolnikih s krvnimi boleznimi

Erik Rupnik

Univerzitetni klinični center Ljubljana

erik.rupnik@kclj.si

Uvod

Bronhoskopija z bronhoalveolarnim izpirkom (BAL) je pomembna diagnostična metoda pri obravnavi bolnikov z okrnjeno imunostjo in zapleti na spodnjih dihalih. Imunosupresija zaradi bolezni ali zdravljenja prispeva k neznačilnemu poteku, z manj simptomi in bolezenskimi znaki, medtem ko radiološke spremembe običajno niso specifične. Bolniki v večini primerov nimajo izmečka, zato je bronhoskopija z BAL ključna preiskava za pridobitev vzorca za mikrobiološko testiranje in dokaz infektivnega povzročitelja. V prispevku predstavljamo analizo rezultatov bronhoskopije in BAL-a pri bolnikih na Kliničnem oddelku za hematologijo v letih 2020 do 2024.

Metode, značilnosti bolnikov in indikacije za preiskavo

Bronhoskopijo opravljamo z upogljivim videobronhoskopom Olympus BF-XP190. Izpirke shranimo v sterilno posodico, ki jo takoj po preiskavi dostavimo na Inštitut za mikrobiologijo. Standardno naročamo naslednje preiskave: kultura na patogene bakterije in glive, PCR na respiratorne viruse, CMV, EBV, HSV 1, VZV, HHV6, PCR na atipične bakterije, pnevmocisto in toksoplazmo, EU-PCR, PCR na *Aspergillus* in *Mucor*, beta D glukan in galaktomanan.

V opazovanem obdobju smo opravili 135 diagnostičnih bronhoskopij z BAL. 76 bolnikov je bilo moških (56 %) in 59 žensk (44 %), mediana starost bolnikov je bila 59 let (21 do 83 let). Najpogostejša osnovna bolezen je bila akutna mieloična levkemija (71 %), sledili so akutna limfoblastna levkemija, diseminirani plazmocitom, ne-Hodgkinov limfom in druge hematološke bolezni. Kar 45 % bolnikov je bilo v fazi induksijskega zdravljenja, 13 % med zdravljenjem s PKMC in še 13 % z zdravljenjem GVHD, kar potrjuje visoko stopnjo imunosupresije. Večina bolnikov je

imela pred preiskavo nevtropenijo (mediana $0,50 \times 10^9/l$) in trombocitopenijo (mediana $30 \times 10^9/l$). V primeru hude trombocitopenije smo trombocite pred preiskavo nadomeščali.

Tabela 1. Osnovna diagnoza in vrsta zdravljenja bolnikov s krvnimi boleznimi pred napotitvijo na bronhoskopijo in BAL

Osnovna diagnoza:	vsi (n=135)		po alo PKMC (n=29)	po avto PKMC (n=2)
AML	96	71%	23	
ALL	10	7 %	2	
MDS	4	3 %	1	
MF	2	1 %	1	
DP	9	7 %	1	2
NHL	8	6 %	1	
DCL	2	1 %		
KML	1	1 %		
razno (AL-A, AA, ITP)	3	2 %		
Zdravljenje:				
KT indukcija	61	45 %		
KT konsolidacija	7	5 %		
azacitidin ($\pm$ venetoklaks)	9	7 %		
alogenska PKMC	12	9 %		
avtologna PKMC	6	4 %		
imunosupresija za GVHD	17	13 %		
razno	13	10 %		
brez (še ni, ni indikacije)	10	7 %		

Pred bronhoskopijo smo vsem bolnikom opravili CT prsnih organov. Indikacije za napotitev na CT so bile: febrilna nevtropenija pri 72 (53 %), febrilno stanje pri 18 (13 %), respiracijska insuficienca pri 11 (8 %), kašelj pri 11 (13 %), dispneja pri 5 (4 %), hemoptiza pri 5 (4 %), patološke najdbe na že opravljeni slikovni diagnostiki pri 10 (7 %) in drugo pri 3 bolnikih. Najpogostejše patološke

najdbe na CT so bile konsolidacije pri 45 (33 %), zgostitve po vzorcu mlečnega stekla pri 30 (22 %), kombinacija konsolidacij in mlečnega stekla pri 21 (16 %) in nodularne zgostitve pri 24 (18 %) bolnikih.

Diagnostični izkupiček BAL-a

Vzorci BAL-a so bili mikrobiološko pozitivni pri 78 % bolnikov. Pri 34 bolnikih (25 %) smo v BAL-u dokazali izključno patogenega povzročitelja, pri 32 bolnikih (24 %) so bili poleg patogena prisotni še mikroorganizmi, ki smo jih šteli za kolonizacijo oz. kontaminacijo in v 29 % smo ugotovili samo kolonizacijo oz. kontaminacijo. Pri 30 bolnikih (22 %) so bili vzorci mikrobiološko negativni.

Pri 66 bolnikih (49 %) smo opredelili klinično pomembnega povzročitelja, kar je omogočilo ustrezno nadaljevanje zdravljenja: bakterijska okužba (8 %), glivna okužba (21 %), virusna okužba (9 %) ter mešane okužbe (10 %). Pri dodatnih 18 % bolnikov smo na podlagi negativnih mikrobioloških izvidov in skladne radiološke slike ter kliničnega poteka postavili diagnozo neinfektivne etiologije. Pri teh bolnikih smo lahko razmislili o opustitvi izkustvenega protimikrobnega zdravljenja ali uvedbi imunosupresivnega zdravila.

Skupno smo torej z BAL-om opredelili etiologijo pljučnih sprememb pri 66% bolnikov.

Tabela 2. Mikrobiološki povzročitelji okužbe v BALu

	Pozitiven izvid	klinično pomembno		Pozitiven izvid	klinično pomembno
Bakterije			Glive		
Citrobacter freundii	1	0	Aspergillus	32	26
E. faecium	5	2	Candida	23	1
E. faecalis	1	0	Fusarium	1	1
Haemophilus influenzae	4	3	Mucor	7	7
Legionella sp	3	3	Pneumocystis yirovecii	8	8
Neisseria sp	1	0	Sacharomyces	1	0
Pseudomonas aeruginosa	6	4	Skupaj	72	43
Rothia mucilaginosa	1	1	Virusi		
Serratia sp	1	0	Adenovirus	1	1
Stenotrophomonas sp	8	7	CMV	6	3
Streptococcus viridans	1	1	EBV	20	3
Skupaj	32	21	HHV6	13	7
			HSV 1	7	5
			Influenca	2	1
			Parainfluenca	1	1
			Rinovirus	2	1
			RSV	2	1
			SARSCoV	2	1
			Skupaj	56	24

Primerjava z literaturo

V raziskavi, ki so jo opravili Choo s sodelavci pri imunokompromitiranih bolnikih s pljučnimi infiltrati, so rezultati BAL-a vplivali na terapijo v 63,3% primerov (1). V podskupini 92 hematoloških bolnikov so z BAL postavili diagnozo v 51,1% primerov, največkrat pri bolnikih s konsolidacijami ali spremembami mlečnega stekla na CT – ugotovitve, ki jih potrjujemo tudi v naši kohorti.

Jorge s sodelavci so pri bolnikih s hematološkimi malignimi boleznimi in pljučnimi infiltrati postavili diagnozo v 42,7% primerov, od tega so 80% predstavljale okužbe, ostalo pa drugi vzroki kot preobremenitve s tekočino, alveolarne krvavitve in GVHD (3). Pri naših bolnikih je bilo med opredeljenimi 28% neinfektivnih diagnoz.

V podobni raziskavi, kjer so obravnavali bolnike s hematološko maligno boleznijo in pljučnimi infiltrati je bilo 87% vzorcev BALa mikrobiološko pozitivnih, 55% so jih opredelili kot patogene in ostalih 32% kot kolonizate (4), kar je zelo podobno našim rezultatom.

Skupno gledano naša analiza potrjuje, da je diagnostični izkupiček BAL-a pri naših bolnikih primerljiv z najboljšimi podatki iz literature.

Varnost postopka

Preiskava je bila v veliki večini primerov varna. Resen zaplet smo zabeležili samo pri enem bolniku, pri katerem se je po preiskavi razvil pljučni edem, ki se je nato razrešil s konzervativnim ukrepanjem. To je primerljivo z objavljenimi podatki (3), kar potrjuje, da je ob ustreznih varnostnih ukrepih BAL izvedljiv tudi v visoko rizični populaciji.

Omejitve in pomen neinvazivnih metod

Bronhoskopije in BAL-a ne izvajamo pri bolnikih s hudo dihalno odpovedjo. Kulture iz BAL-a so le redko pozitivne, saj večina naših bolnikov ob bronhoskopiji že prejema širokospektralni antibiotik in običajno tudi profilaktični antimikotik.

Zaradi vse širše dostopnosti molekularnih in antigenih testov (npr. galaktomanan, PCR) se postavlja vprašanje, ali je invazivna diagnostika še potrebna. Občutljivost teh novih testov na

vzorcih pridobljenih na neinvazivne načine (iz krvi, urina, brisov) je žal še bistveno manjša, kot na vzorcih iz pljuč, zato BAL zaenkrat ostaja nepogrešljiva metoda.

Ob tem velja poudariti, da negativni BAL ni brez diagnostične vrednosti. Pri 24 bolnikih smo na podlagi izključitve okužbe potrdili neinfektivne vzroke, kar je pomembno vplivalo na nadaljnjo obravnavo.

Zaključek

Naše izkušnje potrjujejo, da je BAL dragoceno diagnostično orodje pri hematoloških bolnikih s pljučnimi zapleti. V skoraj 70% primerov je preiskava pripomogla k opredelitvi etiologije pljučnih infiltratov, kar je omogočilo ciljno in racionalno zdravljenje. Diagnostični izkupiček je primerljiv z izidi iz literature.

Literatura

1. Choo R, Naser NSH, Nadkarni NV, Anantham D. Utility of bronchoalveolar lavage in the management of immunocompromised patients presenting with lung infiltrates. *BMC Pulm Med*. 2019 Feb 26;19(1):51. doi: 10.1186/s12890-019-0801-2.
2. Feinstein MB, Habtes I, Giralt S, Stover DE. Utility of Bronchoscopy with Bronchoalveolar Lavage among Hematologic Transplant Recipients in the Era of Noninvasive Testing. *Respiration*. 2021;100(4):339-346. doi: 10.1159/000512376.
3. Jorge L, Torres D, Languasco A, Rodríguez P, Bonvehí P, Temporiti E, Relloso S, Videla C, Herrera F. Clinical Usefulness of Bronchoalveolar Lavage in the Management of Pulmonary Infiltrates in Adults with Hematological Malignancies and Stem Cell Transplantation. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2020 May 1;12(1):e2020025. doi: 10.4084/MJHID.2020.025.
4. Zak P, Vejrazkova E, Zavrelova A, Pliskova L, Ryskova L, Hubacek P, Stepanova V, Kostal M, Koblizek V, Paterova P, Radocha J. BAL fluid analysis in the identification of infectious agents in patients with hematological malignancies and pulmonary infiltrates. *Folia Microbiol (Praha)*. 2020 Feb;65(1):109-120. doi: 10.1007/s12223-019-00712-4.

Učinkovitost transfuzije granulocitov pri hematoloških bolnikih

Tereza Urdih, Matjaž Sever

Univerzitetni klinični center Ljubljana

tereza.urdih@kclj.si

Uvod

Nevtrofilni granulociti predstavljajo najštevilčnejši delež levkocitov in so glavni obrambni mehanizem pri zdravljenju okužb. Pri hematoloških bolnikih se zmanjša njihovo nastajanje zaradi same okvare kostnega mozga ob infiltraciji bolezni ali toksičnega delovanja kemoterapije. Kadar je nevtropenija huda (tj. $< 0,5 \times 10^9/L$) in ji je pridružena bakterijska ali glivična okužba, ki je navkljub ustreznem protimikrobnem zdravljenju neobvladana, lahko za obdobje regeneracije kostnega mozga in zdravljenje okužbe uporabimo transfuzije granulocitov. Vedno več študij in analiz iz klinične prakse dokazuje učinkovitost tovrstnega zdravljenja.

Indikacije za zdravljenje

Huda nevtropenija je običajno posledica bolezni, ki prizadenejo kostni mozeg, ali zdravil, ki ga zavirajo (kemoterapija), lahko pa tudi posledica redkih prirojenih bolezni (sindrom Chediak-Higashi, kronične granulomatoze). Ob hudi nevtropeniji in sočasni okužbi, ki je kljub uporabi ustreznega antibiotičnega zdravljenja ne uspemo obvladati, lahko v obdobju do obnove hematopoeze in tvorbe lastnih nevtrofilcev, slednje nadomeščamo s transfuzijami granulocitov. Za to morejo biti izpolnjena sledeča merila: a) huda nevtropenija $< 0,5 \times 10^9/L$, b) napredovanje bakterijske ali glivične okužbe, kljub ustreznem protimikrobnem zdravljenju, c) bolnik je v postopku aktivnega zdravljenja z namenom doseči ozdravitev osnovne bolezni in d) pričakovana je regeneracija nevtrofilcev in ozdravitev. Ta oblika zdravljenja pa ni indicirana, kadar ne pričakujemo ozdravitve osnovne bolezni, kadar okužbi ni pridružena huda nevtropenija in ob vročini neznanega izvira (FUO).

Pripravek transfuzije granulocitov

Granulocyte pridobimo z afereznim postopkom zdravega prostovoljnega darovalca, ki mora biti skladen s prejemnikom v ABO in RhD sistemu. Darovalci so v prvi vrsti sorodniki in znanci bolnikov, saj je pred odvzemom potrebna priprava z rastnim dejavnikom za granulocyte (filgrastim v odmerku 5 mcg/kg telesne mase darovalca v obliki podkožne injekcije) in/ali kortikosteroidom (metilprednizolon 48 mg ali deksametazon 8 mg per os) dan pred odvzemom (12 ur prej). Ker ima pripravek večje število eritrocitov, limfocitov in trombocitov, mora biti skladen s sistemom ABO in RhD ter obdelan s psoralenom in obsevan. Hranimo jih pri temperaturi 22 °C, tj. na sobni temperaturi. Najdaljši čas uporabe je 24 ur in jih navadno infundiramo še isti dan, neposredno po zbiranju. Za to uporabimo standardni set za transfuzijo eritrocitov, infuzija traja 1 uro. Kot pri ostalih darovalcih krvnih pripravkov, preverimo serologijo na bolezni, ki se prenašajo s krvjo (hepatitis B in C, HIV, sifilis) in CMV, saj morajo prejemniki, ki še niso preboleli okužbe s citomegalovirusom prejeti pripravek CMV negativnega darovalca. V primeru aloimunizacije prejemnika je potrebno preveriti še HLA skladnost.

Granulocyte lahko pridobimo tudi iz »buffy coata« (med centrifugiranjem krvi je to plast, bogata z granulociti) več darovalcev, navadno dvanajstih, ena enota pa vsebuje približno 11×10^9 granulocitov.

Odmerek

Ciljna vrednost granulocitov je med $1,5$ in $3,0 \times 10^8$ granulocitov na kg telesne mase prejemnika na dan. V eni enoti jih mora tako biti vsaj 1×10^{10} granulocitov. Zdravljenje nadaljujemo v obliki dnevnih transfuzij, dokler se ne vzpostavi lastna hematopoeza, ozdravitev okužbe (klinično izboljšanje, padec telesne temperature, negativizacija kužnin) ali pa se kljub tridnevnomu zdravljenju pojavi klinično poslabšanje oz. se razvijejo sopojava.

Kot pri ostalih transfuzijah krvnih pripravkov, se tudi po infuziji granulocitov lahko pojavijo neželeni sopojava, kot so hemolitična in nehemolitična febrilna transfuzijska reakcija (mrzlica, vročina, izpuščaji), s transfuzijo povezana poškodba pljuč (TRALI) ali preobremenitev krvnega

obtoka (TACO), alergijska reakcija ali prenos okužbe, pa tudi aloimunizacija na eritrocitne antigene (HLA, HPA, HNA). Sopojava preprečimo s premedikacijo (acetaminofen, antihistaminik, kortikosteroid).

Rezultati v klinični praksi

Zdravljenje z granulociti se je pojavilo v klinični praksi že pred več kot 40 leti. Opravljene študije in retrospektivne analize zdravljenja z granulociti si niso enotne glede koristi tovrstnega zdravljenja. Največji pregled podatkov je opravil Cochrane, ki je analiziral 10 študij med letoma 1975 in 2015 skupno 587 bolnikov in ni ugotavljal razlike med celokupnim preživetjem v 30 dneh med tistimi ki so bili zdravljeni z granulociti ali brez njih. Z razvojem boljših tehnik afereze, uporabe GCSF, višje koncentracije granulocitov in infuzije na dan zbiranja se je učinkovitost zdravljenja povečala. Nevtrofilci, četudi se po infuziji njihovo število v krvi bistveno ne poveča, migrirajo v mesta okužbe, v tkiva, so aktivni in imajo daljšo življenjsko dobo. Izkušnje iz tujih centrov kažejo na visoko uspešnost nad 90% pri kliničnem izboljšanju in nad 40% pri hematološkem odgovoru. Izpostavljajo pomen hitre prepoznavne indikacij in pravočasen pričetek zdravljenja (glede na klinično stanje, potrebo po intenzivni negi, in ne glede na trajanje febrilnega stanja), kar pripomore k hitrejšemu obvladovanju okužbe, nižjemu številu transfuzij, boljšemu preživetju. Prav tako poudarjajo profilaktično zdravljenje pri bolnikih z visokim tveganjem.

Naše izkušnje

Na KO za hematologijo smo v obdobju od leta 2010 do 2025 zdravili 74 bolnikov, mediana starost 53 (19-70), bolniki so prejeli granulocitne transfuzije v mediani 7 (1-49) odmerkov, od tega je en bolnik bil dvakrat zdravljenje z granulociti. Prejemniki so bili bolniki z akutno levkemijo po prejeti kemoterapiji 50 (68 %), po alogenski presaditvi KMC 13 (18 %), MPN 6 (8 %), DP/NHL 6 (8 %), MDS 2 (3 %). Darovalci so bili v večini primerov sorodniki, stimulirani z GCSF in Medrolom. Od sopojavov smo beležili dva (0,2 %) primera TRALI in po eno (0,1 %) reakcijo s hipotenzijo in hipoksemijo po transfuziji granulocitov druge krvne skupine kot je bil prejemnik sam. Pri 38 bolnikih (51 %) je prišlo do izboljšanja (regeneracija KM, regres okužbe), pri 7 (10 %) do delnega izboljšanja (regres

okužbe, a nato ponovna okužba oz. progres osnovne bolezni), pri preostalih 29 (40 %) pa ni bilo dobrobiti zdravljenja (od teh pri 2 (3 %) bolnikih prekinitev zaradi sopojevov).

Zaključek

Zdravljenje s transfuzijami granulocitov pri hematoloških bolnikih s hudo nevtropenijo in neobvladano okužbo je glede na naše rezultate in podatke iz literature varno in učinkovito, pripomore k hitrejši regeneraciji nevtrofilcev ter zdravljenju okužbe. Pomembno je čim hitreje prepoznati in zdraviti bolnike, ki bi od tovrstnega zdravljenja imeli dobrobit, ustrezno organizirati zbiranje, in pri posameznih visoko tveganih bolnikih razmisliti tudi o profilaktični terapiji s transfuzijami granulocitov.

Literatura

1. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, EDQM, 21. edition, 2023, Chpter 5, part E, 282-288.
2. Estcourt LJ, Stanworth SJ, Hopewell S, Doree C, Trivella M, Massey E. Granulocyte transfusions for treating infections in people with neutropenia or neutrophil dysfunction. Cochrane Database of Systematic Reviews 2016, Issue 4. Art. No.: CD005339.
3. Desai P., Navkudkar A., Bagal B., Dhamne C., Jain H., Chinnaswamy G., Sengar M. et al. Navigating the neutropenic abyss with granulocyte transfusions: Retrospective single-center analysis of effectiveness and safety in India. J Clin Apher. 2023;38:703–710.
4. Vráblová L., Blahutová S., Cermáková Z., Raida L., Szotkowski T., Hubáček J. et al. Granulocyte transfusions collected after steroid priming for severe infections during neutropenia: A single center experience. Transfusion Clinique et Biologique 26 (2019) 299–303.
5. Hadjiyannis Y., Bubar R., Triulzi D.J., Kiss J., Marino C.C., Kaplan A. Optimized high-dose granulocyte transfusions for the treatment of infections in neutropenic patients: A single-center retrospective analysis. Transfusion. 2024;64:1662–1669.

6. Özkan S., Kimiaei A., Safaei S., Sönmezoğlu M., Özkan H.A. Granulocyte Transfusions in Neutropenic Infections: Insights From a Single-Center Study. *Cureus* 16(3).
7. Dilek Gurlek Gokcebay, Sibel Akpınar Tekgunduz. Granulocyte transfusions in the management of neutropenic fever: A pediatric perspective. *Transfusion and Apheresis Science* 57 (2018) 16–19.
8. Rani Jaiswal S., Bhakuni P., Bhagwati G., Joy A., Chakrabarti A., Chakrabarti S. Impact of Preemptive Granulocyte Infusions During Febrile Neutropenia in Patients Colonized with Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria Undergoing Haploidentical Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 25 (2019) 1621-1628.
9. Sirin Koc B., Tekkesin F., Miray Yıldırım U., Cakı Kılıç S. Use of granulocyte transfusion in early period in life-threatening infections of pediatric hematology and oncology patients: A single-center experience. *Transfusion and Apheresis Science* 60 (2021) 103134.

Paliativna obravnava hematoloških bolnikov (SMSZT)

Paliativna obravnava bolnikov v hematologiji

Irena Preložnik Zupan

Univerzitetni klinični center Ljubljana

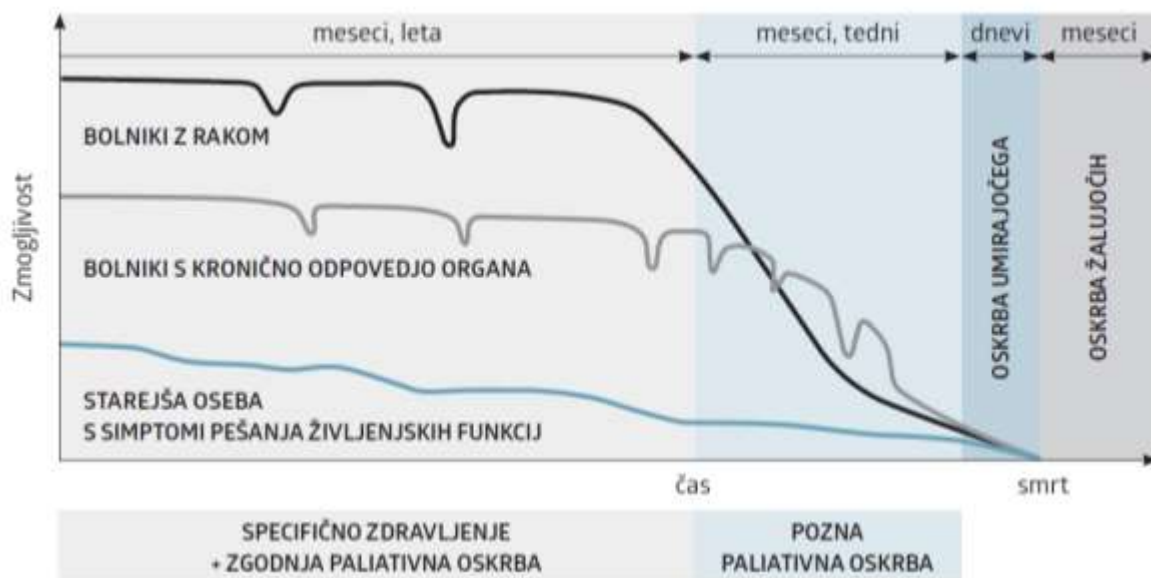
irena.zupan@kclj.si

Hematološke bolezni, kot so levkemije, limfomi, mielodisplastični sindromi in diseminirani plazmocitom, imajo pogosto agresiven potek, so pogosto neozdravljive in lahko povzročajo številne simptome in znake, ki pomembno vplivajo na bolnikovo fizično in psihosocialno stanje. Paliativna obravnava bolnikov v hematologiji je ključnega pomena za izboljšanje kakovosti življenja bolnikov z napredovalimi hematološkimi boleznimi. Ta pristop se osredotoča na lajšanje simptomov, kot so bolečina, utrujenost, slabokrvnost in druge težave, s katerimi se bolniki soočajo v poznejših obdobjih krvnih bolezni. Pomembno je tudi nudenje psihološke podpore bolnikom in njihovim svojcem, saj so hematološke bolezni pogosto kronične in zahtevajo dolgoročno spremljanje. S celostnim pristopom lahko paliativna oskrba prispeva k boljšemu počutju in dostojanstvenemu koncu življenja bolnikov.

Obdobja paliativne oskrbe

Ob ugotovitvi kronične neozdravljive bolezni sledijo naslednja obdobja paliativne oskrbe:

- **Zgodnja paliativna oskrba** – Specifično zdravljenje je integralni del paliativne oskrbe in vpliva na izboljšano kakovost življenja bolnikov ter na preživetje.
- **Pozna paliativna oskrba** – S specifičnim zdravljenjem težko dosežemo še kakšno izboljšanje, bolezen napreduje, potrebno je aktivno vključiti svojce.
- **Obdobje oskrbe umirajočega** – Obdobje paliativne oskrbe bolnika v zadnjih dneh ali tednih življenja.
- **Obdobje žalovanje** – Obdobje poslavljanja od umrlega po njegovi smrti.



Slika 1: Priročnik Paliativna oskrba, 1. izdaja, uredniki: Ebert Moltara M, Malačič S, Gumilar I. Ljubljana: Slovensko združenje za paliativno in hospic oskrbo, 2021

Specifične značilnosti paliativne oskrbe v hematologiji

V primerjavi z drugimi onkološkimi obolenji imajo hematološke bolezni nekatere posebnosti, ki vplivajo na načrtovanje paliativne oskrbe:

- **Nepričakovan in hiter potek bolezni** – Nekatere hematološke bolezni lahko napredujejo zelo hitro, kar otežuje pravočasno uvedbo paliativne oskrbe.
- **Visoka odvisnost od transfuzij** – Bolniki z napredovano boleznijo pogosto potrebujejo redne transfuzije krvi in trombocitov, kar lahko vpliva na odločitve o paliativnem zdravljenju.

- **Možnost agresivnega zdravljenja do poznih faz bolezni** – V hematologiji je pogosto prisoten pristop zdravljenja do zadnjih trenutkov bolezni, kar lahko odloži prehod v paliativno oskrbo.
- **Kompleksna simptomatika** – Bolniki se pogosto soočajo z bolečino, utrujenostjo, težko sapo, okužbami in krvavitvami, ki zahtevajo celostno obravnavo.

Cilji paliativne oskrbe

Paliativna oskrba v hematologiji je usmerjena v:

- **Lajšanje simptomov** – Obvladovanje bolečine, slabosti, utrujenosti, težav s krvavitvami in okužbami.
- **Psihološko in čustveno podporo** – Pomembna je psihosocialna pomoč bolnikom in njihovim svojcem, saj so hematološke bolezni pogosto povezane z dolgotrajnimi hospitalizacijami in negotovostjo glede prognoze.
- **Odločanje o zdravljenju** – Paliativna ekipa pomaga pri odločitvah o nadaljevanju ali opustitvi aktivnega zdravljenja ter pri prehodu v oskrbo na domu ali v hospicu.
- **Dostojanstven konec življenja** – Zagotavljanje podpore v zadnjih dneh življenja, lajšanje trpljenja in omogočanje umiranja v okolju, ki si ga bolnik želi.

Izvajanje paliativne oskrbe

V sodobni hematološki oskrbi se vedno bolj poudarja integracija paliativne medicine že v zgodnejših fazah bolezni, kar omogoča boljše obvladovanje simptomov in kakovostnejšo podporo bolnikom in njihovim svojcem. To ne pomeni prenehanje specifičnega zdravljenja temveč podporno zdravljenje bolnika z neozdravljivo boleznijo. Potreben je multidisciplinaren pristop, ki vključuje sodelovanje zdravnikov hematologov s posebnimi znanji o paliativni oskrbi, medicinskih sester, psihologov, socialnih delavcev in tudi duhovnikov. Pomembno je pravočasno vključevanje paliativnega tima.

Izkušnje na Kliničnem oddelku za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana

V avgustu 2024 smo uvedli mobilni paliativni tim (MPT) in zagotavljamo telefonsko podporo 24/7 za bolnike, ki so vključeni v hematološko paliativno oskrbo in njihove svojce. Bolnike obiščemo na domu v osrednjeslovenski regiji, oddaljene bolnike vključimo v obravnavo v regijskih centrih po predhodnem dogovoru z osebjem MPT v regiji. V Sloveniji je hospitalizacija in obravnava hematoloških bolnikov z maligno hematološko boleznijo možna v vseh bolnišnicah, ki imajo hematologa, kot tudi v negovalnih bolnišnicah ali splošnih bolnišnicah na internističnih oddelkih, kjer hematologa ni.

Literatura

1. Priročnik Paliativna oskrba, 1. izdaja, uredniki: Ebert Moltara M, Malačič S, Gumilar I.
Ljubljana: Slovensko združenje za paliativno in hospic oskrbo, 2021

Paliativna oskrba otrok in mladostnikov na kliničnem oddelku za otroško hematologijo in onkologijo

Klavdija Rauter, Kaja Podlogar

Klinični oddelek za otroško hematologijo in onkologijo, Pediatrična klinika Ljubljana

Paliativna oskrba otrok je specializirana veja zdravstvene nege, namenjena otrokom z življenjsko omejujočimi boleznimi. Njen cilj je izboljšati kakovost življenja bolnikov in njihovih družin s celostnim pristopom, ki vključuje fizične, psihološke, socialne in duhovne vidike oskrbe. Pomembno je poudariti, da paliativna oskrba ne pomeni opustitve zdravljenja, temveč se pogosto izvaja vzporedno s kurativnimi postopki, prilagojenimi potrebam in željam otroka ter njegove družine (5).

Ključni elementi pediatrične paliativne oskrbe

Celostna obravnava bolnika: Paliativna oskrba se osredotoča na lajšanje bolečin in drugih simptomov ter na psihološko, socialno in duhovno podporo otroku in njegovi družini.

Multidisciplinarni pristop: V oskrbo so vključeni različni strokovnjaki, vključno z zdravniki, medicinskimi sestrami, psihologi in socialnimi delavci, ki skupaj oblikujejo in izvajajo načrt oskrbe.

Podpora družini: Paliativna oskrba prepoznava vpliv bolezni na celotno družino in zagotavlja podporo staršem, sorojencem ter drugim bližnjim, da lažje obvladujejo čustvene in praktične izzive.

Kontinuiteta oskrbe: Oskrba se prilagaja spreminjajočim se potrebam otroka in družine ter zagotavlja neprekinjeno podporo skozi celoten potek bolezni (2).

Glavni cilji paliativne oskrbe otrok so: Lajšanje telesnih simptomov, kot so bolečina, slabost, težave z dihanjem in nevrološki simptomi. Pomoč pri obvladovanju psihosocialnih in duhovnih izzivov ter podpora družini in pomoč pri soočanju z žalovanjem. Eden glavnih ciljev je čim večji del paliativne oskrbe v domačem okolju (4).

Medicinska sestra ima ključno vlogo v paliativni oskrbi otrok, saj je pogosto ona prvi stik z otrokom in družino. Njene naloge vključujejo nego in lajšanje simptomov kot so: bolečina (uporaba farmakoloških in nefarmakoloških metod). Pri težavah z dihanjem: kisikova terapija, dihalne tehnike, pozicioniranje. Ob slabosti in bruhanju uporaba antiemetikov ter sprememba prehrane. Ob tesnobah in nespečnostih nudenje psihološke podpore otroku pri izražanju občutkov in skrbi. Družini svetuje pri soočanju s strahovi ter pripravi otroka in družino na prehod v končno fazo bolezni – fazo umiranja. Medicinske sestre morajo imeti razvite veščine empatične komunikacije (3).

Terminalna faza paliativne oskrbe otrok je obdobje, ko bolezen napreduje do stopnje, ko zdravljenje ni več usmerjeno v ozdravitev, temveč v zagotavljanje čim boljše kakovosti življenja in udobja otroka. To obdobje se lahko razlikuje glede na posamezno bolezen in potek stanja, vendar vključuje specifične izzive za otroka, družino in zdravstveno ekipo (5). V terminalni fazi paliativne oskrbe otroku lajšamo bolečino, težave z dihanjem ter druge neprijetne simptome. Otroci lahko izražajo strah, negotovost, ne sprejemajo smrti, imajo vprašanja o smrti na katera jim je potrebno odgovoriti na njim razumljiv način. Pomembno vlogo ima tudi duhovna oskrba, katera pa je prilagojena otrokovim in družinskim vrednotam ter prepričanjem, ter priprava na slovo, kjer svojcem pomagamo pri ustvarjanju spominov in razumevanju procesov ob smrti otroka (3).

Paliativna terminalna sedacija je medicinski postopek, pri katerem se neozdravljivo bolnemu pacientu, ki je v zadnji fazi življenja, s kontroliranim dajanjem sedativov zmanjša zavest, da bi omilili hude in neobvladljive simptome (npr. hude bolečine, težko dihanje, vznemirjenost, delirij). Gre za human pristop k paliativni oskrbi, kadar druge metode lajšanja trpljenja niso učinkovite. Indikacije za terminalno sedacijo so: neobvladljive bolečine, huda dispnea, agitacija ali delirij, refraktarna slabost in bruhanje, hud občutek dušenja ali tesnobe. Sedacija se uporablja le, kadar so izčrpane vse druge možnosti za lajšanje simptomov. Uporabljajo se benzodiazepini (npr. midazolam), opiodi (npr. morfin, vendar ne za sedacijo, temveč za lajšanje bolečin in dispneje), antipsihotiki ali barbiturati. Cilj ni povzročiti smrt, ampak omogočiti mirno prehajanje v umirjeno stanje brez trpljenja. Stopnja sedacije je prilagojena bolnikovim potrebam – lahko je blaga (bolnik

je še odziven) ali globoka (popolna izguba zavesti). Običajno se izvaja v zadnjih dneh ali urah življenja. Paliativna sedacija ni evtanazija. Pri evtanaziji je cilj povzročiti smrt, medtem ko je pri sedaciji cilj lajšanje trpljenja. Uporablja se le pri bolnikih v zadnji fazi življenja, ko je smrt neizogibna in zelo bližnja. Vedno se izvede po posvetovanju z bolnikom (če je mogoče), družino in medicinskim timom (1).

Paliativna oskrba otrok je ključnega pomena za zagotavljanje kakovostnega življenja neozdravljivo bolnim otrokom in njihovim družinam. S celostnim in prilagojenim pristopom ter sodelovanjem različnih strokovnjakov lahko otrokom omogočimo dostojanstveno in čim boljše življenje kljub težki bolezni.

Literatura

1. Meglič, A. (2022). Izzivi sodobne slovenske pediatrične paliativne oskrbe. *Zdravniški vestnik*, 91(7-8), 285–295.
2. Marko, L. (2024). Doživljanje paliativne oskrbe otroka pri medicinskih sestrah. Diplomsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za zdravstvene vede.
3. Sovinec, E. (2024). Paliativna oskrba otrok in vloga medicinske sestre. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta.
4. Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ). "Paliativna oskrba v Sloveniji." nizj.si
5. WHO. "Palliative Care for Children." <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/palliative-care-for-children>

Organizacija paliativne oskrbe v Splošni bolnišnici Slovenj Gradec

Tanja Hovnik Markota

Splošna bolnišnica Slovenj Gradec, Oddelek za interno medicino, Enota paliativne oskrbe

tanja.hovnik@sb-sg.si

Paliativna oskrba (PO) je sestavni del zdravstvenega in socialno varstvenega sistema na vseh ravneh in s tem neodtujljiv element človekove pravice do zdravstvenega in socialnega varstva. Paliativna oskrba temelji na obveščenosti bolnika o njegovi bolezni, vključitvi bolnika v odločanje o zdravstveni obravnavi in podpori njegovih bližnjih in se mora izvajati povsod, kjer so neozdravljivo bolni in umirajoči bolniki, tako v stacionarni oskrbi, kot na področju intenzivne kot splošne nege, ambulantno ter na domu. Cilj PO ni zgolj lajšanje telesnih bolečin, temveč tudi duhovnih, socialnih in psiholoških stisk. Cilj je torej celostna obravnava in oskrba, v skladu z vrednotami in željami bolnika. Njena učinkovitost temelji na znanju in sodelovanju različnih strok. Kot izhodišče pri ustanavljanju paliativne dejavnosti v našem zavodu je služil Državni program paliativne oskrbe, ki je prvi in temeljni dokument za razvoj paliativne oskrbe v Sloveniji. V njem so navedena priporočila za organizacijo mreže PO v Republiki Sloveniji. V predpisu, skladnim z Zakonom o zdravstvenem varstvu in zdravstvenem zavarovanju, je v programu zdravstvenih storitev za večjo preglednost, kakovost in učinkovitost zdravstvenega varstva opredeljena PO, ki jo izvajajo vsi zdravstveni delavci in sodelavci, ki prihajajo v stik z bolniki in se izvaja na vseh ravneh zdravstva. Izvajanje dejavnosti po principih paliativne oskrbe je potrebno prilagoditi okolju, v katerem jo izvajamo, po načelih enakosti in dostopnosti in v skladu s priporočili Svetovne zdravstvene organizacije in Evropske unije. Vlada Republike Slovenije mora zagotoviti dostop do paliativne oskrbe vsem, ki jo potrebujejo in želijo.

Kot splošna bolnišnica izvajamo specialistično PO za »statistično« koroško regijo, za območno enoto (OE) Ravne na Koroškem.

Občine, ki spadajo k OE Ravne na Koroškem so:

- Občina Črna na Koroškem
- Občina Dravograd
- Občina Mežica
- Občina Mislinja
- Občina Muta
- Občina Podvelka
- Občina Prevalje
- Občina Radlje ob Dravi
- Občina Ravne na Koroškem
- Občina Ribnica na Pohorju
- Mestna občina Slovenj Gradec
- Občina Vuzenica
- Občina Velenje, Šoštanj, Šmartno ob Paki (izpostava Velenje)
- Občina Mozirje, Ljubno ob Savinji, Gornji Grad, Solčava in Luče (izpostava Mozirje).

Paliativno oskrbo izvaja zdravnik specialist iz paliativne oskrbe, koordinator PO ter kader zdravstvene nege na internem oddelku (diplomirane medicinske sestre, tehniki zdravstvene nege), nekateri imajo pridobljena specialna znanja iz PO. Zdravnik in negovalno osebje je zaposleno v tej enoti za poln delovni čas. V timsko delo se po potrebi vključujejo še: dietetik, socialni delavec, fizioterapevt in duhovnik. Izkustveni normativ za stacionarno namestitev za izvajanje PO je 80 - 100 postelj na milijon prebivalcev.

Število postelj v določeni regiji je odvisno od demografskega in socialno ekonomskega stanja ter od razpoložljivosti glede na ostale specialistične paliativne skrbstvene dejavnosti. Glede na število prebivalcev v OE ZZZS Ravne na Koroškem, bi v regiji potrebovali najmanj 12 postelj (vir: ZZZS, evidenca OZZ; 2008). V Splošni bolnišnici Slovenj Gradec, v okviru Oddelka za interno medicino izvajamo specialistično paliativno oskrbo od leta 2015. V ta namen imamo 13 bolnišničnih postelj. Izvajamo tudi ambulantno PO, vsakodnevno, po dogovoru, glede na potrebe bolnikov. V

ambulanti izvajamo predvsem diagnostično terapevtske posege (izpraznilne plevralne punkcije, punkcije ascitesa) in kontrole po dogovoru.

Priporočljiva je zgodnja vključitev bolnikov v PO, sicer je možno vključevanje na katerikoli stopnji kronične neozdravljive bolezni, glede na oceno stanja bolnika, oceno verjetne prognoze bolezni in oceno specifičnih potreb bolnika in njegovih bližnjih. Pred vključitvijo v PO je potrebno bolniku razložiti principe PO, in pridobiti njegovo soglasje.

Vzroki za napotitev bolnikov v PO

Najpogostejši vzrok za napotitev so poslabšanje kronično neozdravljive bolezni in ureditev terapevtsko neurejenih simptomov, ureditev psiholoških, socialnih, duhovnih in eksistenčnih potreb bolnika in njegovih svojcev.

Poti vključevanja bolnikov v PO

Potrebo po paliativni oskrbi lahko na podlagi vključitvenih kriterijev prepozna:

- sobni zdravnik – specialist internist,
- sodelavec s področja zdravstvene nege,
- zdravnik drugih specialnosti v bolnišnici,
- družinski, splošni zdravnik in
- patronažna služba.

Tako imamo jasno definirane kriterije za napotitev v PO za onkološke bolnike, bolnike z odpovedjo organskega sistema (srčno popuščanje, kronična obstruktivna bolezen pljuč, jetrna, ledvična odpoved in nevrološka obolenja – demenca, ALS, možganska kap ...).

Pričakovane koristi paliativne oskrbe:

- boljša kakovost storitev za bolnike in njihove bližnje,
- boljša stroškovna učinkovitost – racionalizacija stroškov zdravstvene oskrbe,
- bistveno zmanjšanje stopnje akutne bolnišnične obravnave,
- racionalizacija uporabe zdravil in storitev zdravstvenega sistema,

- povečanje deleža zdravstvene obravnave na domu,
- več smrti v okolju, ki si ga bolnik želi (najpogosteje v domačem okolju).

Koordinirana paliativna oskrba

Koordinirana paliativna oskrba se lahko začne že pred bolnišnično obravnavo, nadaljuje med njo in se konča z usklajenim načrtom odpusta ter spremljanjem bolnika po odpustu. Koordinator v PO je povezovalec vseh členov: bolnika, njegovih bližnjih, članov paliativnega tima ter posameznikov pomembnih za bolnika. Koordinacijo izvaja koordinatorica paliativne oskrbe Tanja Hovnik Markota, mag. zdravstvene nege.

Delo koordinator izvaja neposredno pri bolniku in njegovih bližnjih na oddelku, v ambulantni, bolnika spremlja, ne glede na njegovo nastanitev doma s svojci ali v domu starejših občanov.

Naloge koordinatorja in aktivnosti ob odpustu so:

- komunikacija z bolnikom in bližnjimi,
- prepoznavanje potreb, trenutnih in predvidenih simptomov napredovale bolezni, ocena stopnje samooskrbe, svetovanje, načrtovanje aktivnosti, vrednotenje,
- koordinira obravnavo znotraj bolnišnice (zdravstveni tim, socialno službo, duhovno oskrbo, prehranski tim)
- koordinira obravnavo zunaj bolnišničnega okolja (komunicira s patronažno službo, družinskim zdravnikom (zelo redko).

Izvajamo torej oskrbo v času hospitalizacije ter podporno koordinacijo in svetovanje strokovnim in nepoklicnim izvajalcem pri obravnavi bolnika in njegovih bližnjih.

Kontakti v Splošni bolnišnici Slovenj Gradec:

- 24 urno dosegljivost po telefonu zagotavlja zdravnica specialistka paliativne oskrbe ga. Simona Šipek, dr. med.,
- 6:00 - 14:00 (pon-pet) je dosegljiva tudi koordinatorica paliativne oskrbe ga. Tanja Hovnik Markota, mag. zdravstvene nege.

V Sloveniji je še veliko izzivov kako zagotoviti pravočasno paliativno oskrbo bolnikom, ki jo potrebujejo (odraslim in otrokom), zagotoviti zadostno število multidisciplinarnih timov z ustrežno izobrazbo, ustrezne službe za pomoč pri negi dosegljive vsem, podpora bolnikovim bližnjim, učinkovito povezovanje in koordiniranje v obstoječem zdravstvenem sistemu ter uvesti ukrepe za preprečevanje izgorelosti med izvajalci paliativne oskrbe.

Želimo si, da bi Državni program paliativne oskrbe polno zaživel na vseh nivojih zdravstvenega varstva in resnično postal integriran del bolnišnične obravnave tudi v Splošni bolnišnici Slovenj Gradec.

Literatura

- 1 Državni program Paliativne oskrbe. Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije. Ljubljana, 2010.
- 2 Ebert Moltara M., Bernot M. Paliativna oskrba odraslih bolnikov z rakom v Sloveniji: temeljni pojmi in priporočila. Ljubljana: Onkološki inštitut, 2023.
- 3 World Health Organisation. (2002). National cancer control programmes: policies and managerial guidelines, 2nd ed., Geneva, 2002.
- 4 LUNDER, Urška. Paliativna oskrba - njena vloga v zdravstvenih sistemih. Zdrav Vestn 2003, 72: 639-642.
- 5 Predlog Plana zdravstvenega varstva. Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije. Ljubljana, 2007.
- 6 Predlog Zakona o dolgotrajni oskrbi in zavarovanju za dolgotrajno oskrbo. Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije. Ljubljana, 2006.
- 7 Poročilo o zdravstvenem stanju in zdravstvenem varstvu prebivalcev Slovenije. Aneks 4, Inštitut za varovanje zdravja RS, september 2006.
- 8 Resolucija o nacionalnem planu zdravstvenega varstva 2008-2013 "Zadovoljni uporabniki in izvajalci zdravstvenih storitev" (ReNPZV) (Uradni list RS, št. 72/08 (47/08 popr.).

- 9 Viallard, M.L. (2004). A meeting point between palliative and supportive care. *European Journal of Palliative Care*, 11(3):91.
- 10 Zakon o zdravstvenem varstvu in zdravstvenem zavarovanju. Uradni list RS, št. 72/06 - uradno prečiščeno besedilo.
- 11 Zakon o pravicah bolnikov. Uradni list RS, št. 15/2008.

Oskrba paliativnih bolnikov na domu

Maja Janežič

Mobilni paliativni tim, Splošna bolnišnica Novo mesto

maja.janezic@sb-nm.si

Iz raziskav je razvidno, da si želi biti večina ljudi v obdobju napredovanja bolezni čim več časa doma, želijo si biti obdani z njim pomembnimi osebami, morda tudi hišnimi ljubljenci in skleniti življenjsko pot v domačem okolju, obdani z toplino in ljubeznijo. Brez pomoči in podpore zdravstveno usposobljenega kadra je to zelo težko. V oskrbo bolnika na domu se vključuje osebni izbrani zdravnik (OIZ), ki ima znotraj ordinacijskega časa vključen tudi čas za hišne obiske in patronažna medicinska sestra. OIZ nima toliko časa za obravnavo, kot bi si ga želeli paliativni bolniki v domačem okolju, velikokrat se pojavijo kompleksnejše težave in simptomi, ki potrebujejo specialna znanja in obravnavo. Za oskrbo paliativnih bolnikov na domu potrebujemo specialistične time, ki imajo specialna znanja, izkušnje in čas, ki ga lahko namenijo tako paliativnemu bolniku kot njegovim pomembnim bližnjim s hišnimi obiski na njegovem domu.

Za oskrbo paliativnih bolnikov na domu smo v Sloveniji vzpostavili mrežo mobilnih paliativnih timov (MPT). V Splošni bolnišnici Novo mesto MPT deluje od 1. 9. 2021. Do 17. 3. 2025 smo v obravnavo MPT vključili 978 bolnikov. V večini so to onkološki bolniki, obravnavamo pa tudi bolnike z ostalimi neozdravljivimi boleznimi (srčno popuščanje, demenca,...), ki imajo kompleksne simptome in težave.

Vsakega bolnika obravnavamo celostno – njegovo telo, psiho, dušo in okolje. Bolniku skušamo olajšati simptome, težave ali poiskati pomoč oz. rešitev za težavo, ki se pojavi. Povezujemo se z ostalimi strokovnjaki (psiholog, dietetik, internist,...), OIZ, patronažno službo, nevladnimi organizacijami (Slovensko društvo Hospic, Rdeč križ,...), društvi... V obravnavo ne vključimo le bolnika, ampak tudi njegove pomembne bližnje.

MPT obišče bolnika v domačem okolju, opravimo prvi hišni obisk. Zaželeno je, da so na prvem obisku prisotni tudi njegovi pomembni bližnji, da lahko izvedemo družinski sestanek. Zdravnik

MPT opravi pregled bolnika in se z njim pogovori, če je izvedljivo zagotovimo individualnost in intimo, da ob tem pregledu niso prisotni ostali udeleženci. Nato se zdravnik MPT pogovori še s pomembnimi bližnjimi, diplomirana medicinska sestra opravi meritve vitalnih funkcij in izvede zdravstveno vzgojno delo. Na družinskem sestanku se pogovorimo o opažanjih, simptomih, težavah, dilemah in skušamo najti rešitve. Naredimo paliativni načrt in se dogovorimo glede nadaljnjih obravnav. Tako bolnik kot njegovi pomembni bližnji imajo možnost telefonske konzultacije, telefonsko številko dobijo že ob prvem kontaktu z MPT.

Hišne obiske izvajamo načrtovano, glede na predhodne dogovore in potrebe posameznega bolnika in njegovih pomembnih bližnjih. Vsakemu bolniku in njegovim bližnjim pristopimo individualno. Ljudje smo različni, imamo različna prepričanja, navade, potrebe. V sedanjem obdobju se soočamo tudi z multikulturnostjo, nepoznavanjem slovenskega jezika,.. kar nam predstavlja ovire in nove izzive.

Bolnikove pomembne bližnje poučimo in opolnomočimo z znanjem o dajanju terapije, lajšanju bolečin, slabosti, težkega dihanja, skrbi za redno odvajanje blata, negovanje ter skrbi za bolnega in umirajočega. Podamo tudi informacije kako ukrepati ob nastopu smrti.

Kljub želji bolnika ali svojcev, vsi bolniki ne morejo bivati v domačem okolju, nekateri vsaj do konca življenja ne. V takih primerih zgodaj iščemo ustrezno varno namestitev. Največkrat so taki bolniki sprejeti v Hišo Ljubhospic v Ljubljani, katera je namenjena bivanju umirajočih, katerih pričakovana doba preživetja je manj kot mesec dni. Paliativnim bolnikom se lahko pripetijo tudi akutna stanja (padec in poškodbe, krvavitve,...), ki zahtevajo posredovanje dežurne službe in sprejem v bolnišnico.

Mesec dni po smrti bolnika pokličemo žalujoče pomembne bližnje, da preverimo kako poteka žalovanje. Izkazalo se je, da v primerih, ko so imeli ljubljeno osebo v domačem okolju in do smrti ob sebi, se žalovanje začne že v obdobju umiranja, se od nje poslovijo in žalovanje poteka brez težav. Ob klicu nam največkrat povedo, da so dobro, da so pomirjeni, saj vedo, da so naredili vse za ljubljeno osebo in da je umiranje potekalo mirno in brez bolečin.

MPT je velik doprinos za paliativne bolnike in njihove pomembne bližnje, saj so v domačem okolju in ne izgubljajo dragocenih trenutkov z nepotrebnim bivanjem v bolnišnici. Bivanje paliativnih bolnikov doma omogoča doprinos tudi za ostale bolnike, saj jim s prostimi bolnišničnimi posteljami omogočimo bolnišnično zdravljenje ter s tem izboljšanje ali povrnitev zdravja.

Želimo si, da bi bila celotna Slovenija pokrita z mrežo MPT in bi vsi bolniki v času napredovanja bolezni, umiranja in smrti imeli enake možnosti bivanja v domačem okolju.

Psihološka podpora svojcev bolnikov v paliativni oskrbi

Nina Erjavec Merklin

Univerzitetni klinični center Ljubljana

nina.erjavec.hema@kclj.si

Pomen psihosocialne podpore je na področju paliativne obravnave bolnikov s hematološkimi boleznimi že široko prepoznan. Poleg bolnikov imajo svoje lastne želje in potrebe po informiranosti, čustveni podpori ter praktični pomoči pri negi svojcev tudi bolnikovi bližnji. Skrb za svojce naj bi se začela že v času diagnoze in zdravljenja, saj imajo tisti, ki ne prejmejo primerne podpore in informacij v zgodnjih fazah zdravljenja večje težave s soočanjem v poznejših fazah bolezni. Zaradi neizpolnjenih potreb se svojci težje znajdejo v vlogi skrbnika, tako bolnik kot svojci imajo slabšo kvaliteto življenja, sami pa imajo večjo verjetnost za poslabšanje telesnega in psihičnega zdravja, med drugim za razvoj anksioznih in depresivnih motenj.

V prispevku bo opisano soočanje svojcev s stresno situacijo in podrobnejše opisani dejavniki, ki lahko vplivajo na njihovo psihično blagostanje ter strategije, kako jih lahko člani paliativnega tima podpremo.

Soočanje z boleznijo in paliativnim zdravljenjem

Tako pacient kot družina prehod z aktivnega k paliativnem zdravljenju zaznavajo kot stresni dogodek. Pri obravnavi pacientov in njihovih družin je dobro razumeti, na kakšen način se s stresorji spopadajo, za kar lahko uporabimo Lazarusov model stresa in soočanja s stresom.

Ko se v življenju pojavi stresna situacija, pri posamezniku najprej pride do procesa kognitivne ocene, s katerim ocenijo dva faktorja. Prvi je, *ali situacija ogroža posameznikovo psihično in/ali fizično blagostanje*. Nadalje oceni, *ali ima zadostne vire za spoprijemanje z zahtevami situacije*. Stopnja stresa, ki jo doživlja, je torej odvisna od ocene, ki jo naredi in vpliva tudi na telesne in psihične reakcije v situaciji. Stresno situacijo lahko posamezniki ocenijo kot izgubo, grožnjo ali izziv. Tisti, ki jo doživljajo kot izziv, menijo, da imajo zadostne vire za soočanje. V situaciji doživljajo

več prijetnih čustev, si bolj zaupajo in svoja vedenja ocenjujejo kot bolj učinkovita. V obravnavi družine torej strmimo k temu, da svojce opremimo z viri, ki jih potrebujejo, da bi lahko na situacijo gledali bolj kot na izziv in se tako čim dlje uspešneje soočali s stresno situacijo.

Glede na situacijo in posameznikove osebnostne lastnosti se razlikujejo njihovi načini soočanja s situacijo. Prvi način soočanja je uporaba *na problem osredotočenih strategij*. Svojci tedaj poskušajo rešiti problem, ki povzroča stres. To delajo tako, da poskušajo zmanjšati zahteve situacije ali izboljšati svoje vire za soočanje. Ta strategija prevladuje v zgodnejših fazah zdravljenja bolni pacienta. Drugi način soočanja pa so *na uravnavanje čustev osredotočene strategije*. Tedaj svojci ocenijo, da nimajo veliko možnosti za izboljšanje situacije in se osredotočijo na zniževanje čustvene napetosti. Nekateri načini so lahko škodljivi, npr. škodljiva uporaba psihoaktivnih stvari, drugi pa so lahko zelo koristni, npr. iskanje čustvene podpore pri svojcih ali strokovnjakih. Ta način soočanja s stresom je bolj značilen za kasnejše faze bolezni. Oba načina soočanja sta smiselna in imata svoje mesto v poteku bolezni, v kolikor način soočanja bolniku in svojcem ne škoduje.

Potrebe svojcev bolnikov v paliativni obravnavi

Razumevanje potreb svojcev glede nege bolnika prispeva k izboljšani paliativni obravnavi tako za bolnika kot člane družine. Združimo jih lahko v štiri področja, na katerih družine izražajo potrebe:

- **Bolnikovo udobje**

O potrebi po tem, da je bolniku udobno in ne trpi, svojci poročajo najpogosteje. Veliko bolnikov z rakom v napredovani fazi poroča o hudi bolečini, kar svojci zaznavajo kot napredovanje bolezni in znak bližajoče se smrti. Bližnji lahko tudi sami prispevajo k slabšemu uravnavanju bolečine zaradi nezadostne uporabe protibolečinskih (predvsem opioidnih) zdravil. Ta je posledica strahu pred respiratornimi težavami ali pred razvojem tolerance in odvisnosti od opioidov. Tesnoba se pojavi tudi, ko bolniki doživljajo dispnejo, utrudljivost, slabost ali anksioznost. Zaradi prisotnosti opisane simptomatike se lahko počutijo krive, ker niso bolje poskrbeli za pacienta. Stresno doživljanje pacientov lahko ublažimo tako, da jim nudimo primerno podporo.

- Potreba po informacijah

Bolnikovi svojci si želijo biti dobro informirani o njegovi bolezni in skrbi zanj. Pri informiranju so zelo koristni sestanki s paliativnim timom, saj imajo tedaj svojci priložnost postavljati različna vprašanja. Bližnji pri medicinskih sestrah posebno cenijo, da jih podajo informacije glede znakov približujoče se smrti in 24-urno dostopnost informacij, sploh v krajih, ki so bolj oddaljeni od večjih zdravstvenih centrov.

- Potrebe, ki so posledica slabšanja zdravstvenega stanja bolnika

Vloga primarnega skrbnika je zelo stresna, vir stresa predstavlja negotovost glede zdravljenja, pomanjkanje znanja o negi, sprememba vlog v družini, pomanjkanje socialne podpore, strah pred osamljenostjo, ipd. Ena od najbolj zahtevnih in stresnih izkušenj v času paliativne oskrbe je za svojce upad v psihološkem funkcioniranju bolnika, ki nastane zaradi telesne bolezni. Zmedenost, razdražljivost ali spremembe v osebnosti bolnika pri svojcih sprožajo čustva žalovanja, jeze in obupa, s katerimi se je zaradi zahtev po negi svojca težje spopadati. V času intenzivne nege bolnika lahko svojci močno izčrpajo svoje vire soočanja, kar vodi v izčrpanost, izgorelost in izolacijo.

- Čustvene potrebe

Družine potrebujejo podporo pri soočanju z izgubo, bližajoči se smrti pacienta, komunikaciji znotraj družine in lastni čustveni stiski. Podpremo jih lahko na več področjih, npr. pri ohranjanju skrbi zase in konstruktivnem soočanju s spremembami. Vključeni smo tudi v obravnavo družine po smrti bolnika, saj se pri družinskih članih, ki so priča bolj travmatičnem poteku bolezni pri bližnjem po smrti razvije zapleteno žalovanje. Čustvene zahteve, vključene v spremljanje umiranja in smrt bližnjega, svojci ocenjujejo kot bolj zahtevne od fizičnih zahtev in močno vplivajo na duševno zdravje.

Depresija je v primerjavi s splošno populacijo pogostejša pri svojcih bolnikov v paliativni oskrbi in ostaja pogostejša še več let po smrti bolnika. Pogosto se jo spregleda in pripiše normalni reakciji na stresno bolezen, zaradi česar svojci ostanejo brez podpore.

Podporne intervencije

- Deljenje informacij

Informacije, za katere smo ugotovili, da jih družina potrebuje, podajamo v mirnem prostoru. Če je možno, naj bosta prisotna dva svojca. Ponudimo jim tudi pisni material (npr. letake) ali video posnetke. Pri podajanju informacij uporabljamo enostaven jezik ter ne podamo veliko informacij naenkrat. Spodbudimo postavljanje vprašanj ter preverjamo, ali je družina informacije razumela.

- Pomoč družini pri lajšanju bolečine in neudobja pacienta

Ocenimo, kako družina razume simptome, njihove strahove, napačne predstave in prepričanja glede uporabe opioidnih in drugih zdravil. Ponudimo jim način komunikacije o pacientovih simptomih, npr. naj ocenijo pacientovo bolečino na lestvici od 0 do 10. Informiramo jih o uporabi zdravil, varnosti opioidnih zdravil, lajšanju bolečine, preventivnem pristopu k lajšanju bolečine ter o tem, kdaj naj pokličejo pomoč.

- Nudenje čustvene podpore

Spodbujamo svojce, da spregovorijo o svojih čustvih ter se nanje odzivamo z empatijo in brez obsojanja. Izogibamo se prekinjanju pogovora ali želji po spreminjanju njihovega pogleda na situacijo.

- Podpora pri sprejemanju odločitev

Identificiramo kako družina ponavadi sprejema odločitve, kako rešujejo konflikte v družini, kadar se glede odločitev ne strinjajo in jih povprašamo o tem, koliko naj bomo v sprejemanje odločitev vključeni zdravstveni delavci.

- Priprava na poslabšanje bolnikovega stanja

družinskim članom svetujemo glede možnih sprememb simptomov, na katere znake naj bodo pri tem pozorni ter kakšna sprememba nege je ob tem potrebna.

- Napotitev v podporno obravnavo

Družine naj vedo, da je napotitev v psihološko ali psihiatrično obravnavo pogosta. Povemo jim, da je pogovor v tem času lahko v pomoč pri soočanju. Napotitev kmalu po začetku paliativne oskrbe svojcem pomaga, saj pridobijo več strategij soočanja.

Čas paliativne oskrbe je za večino svojcev stresno, naporno obdobje. Člani paliativnih timov in ostalo zdravstveno osebje lahko pripomore k vzdrževanju njihovega psihološkega zdravja in blagostanja s poznavanjem in odzivanjem na njihove potrebe.

Literatura

- 1 Hudson P, Remedios C, Zordan R, Thomas K, Clifton D, Crewdson M, et al. Guidelines for the psychosocial and bereavement support of family caregivers of palliative care patients. *Journal of Palliative Medicine* [Internet]. 2012 Mar 5;15(6):696–702. Available from: <https://doi.org/10.1089/jpm.2011.0466>
- 2 Hudson PL, Remedios C, Thomas K. A systematic review of psychosocial interventions for family carers of palliative care patients. *BMC Palliative Care* [Internet]. 2010 Aug 5;9(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/1472-684x-9-17>
- 3 Kristjanson LJ, White K. Clinical support for families in the palliative care phase of hematologic or oncologic illness. *Hematology/Oncology Clinics of North America* [Internet]. 2002 Jun 1;16(3):745–62. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0889-8588\(02\)00023-0](https://doi.org/10.1016/s0889-8588(02)00023-0)

Psihološka podpora žalujočim po izgubi svojca

Ivana Kreft Hausmeister

Klinični oddelek za otroško hematologijo in onkologijo, Univerzitetni Klinični center Ljubljana

ivana.kreft@kclj.si

Uvod

Izguba ljubljene osebe je lahko ena najtežjih življenjskih izkušenj. Družinski člani, ki trpijo zaradi izgube, se pogosto znajdejo v zapletenem svetu čustev, ki običajno vključuje čustva žalosti, hrepenenja, jeze, krivde, zmedenosti in odrevenelost. Približno 10 % ljudi ima po smrti svojca težave, da bi se prilagodili na novo situacijo, na življenje brez pomembne osebe.

Žalovanje

Žalovanje je naravni odziv na izgubo, hkrati pa je proces lahko zapleten in se razlikuje od osebe do osebe. Odvija se edinstveno, z različno intenzivnostjo in trajanjem. Tako tudi ni »pravega« načina žalovanja. Pogosto poteka v petih fazah, čeprav ne nujno v tem zaporedju:

1. Zanimanje, da je prišlo do izgube.
2. Jeza, ki vključuje tudi razočaranje, užaljenost ali krivdo, usmerjena proti drugim, sebi ali pokojniku.
3. Pogajanje, ki vsebuje misli o tem, „kaj bi bilo, če bi bilo“, in obžalovanje, kaj bi lahko naredili drugače.
4. Depresija, ki vsebuje globoka žalost, osamljenost ali umik iz vsakodnevnih dejavnosti.
5. Sprejemanje, ko je v ospredju postopno sprijaznjenje z izgubo in učenje, kako živeti naprej brez pomembne osebe.

Poleg opisanih faz žalovanja, je Kübler-Rossova opredelila tudi stanje šoka, delno zanimanje, pripravljalo žalovanje (znano tudi kot pričakovano žalovanje), upanje in dekatekso (pomanjkanje motivacije za vlaganje duševne ali čustvene energije v zunanji svet). Omenila je tudi druge faze,

kot so krivda, tesnoba in otrplost. Žalovanje je proces, ki se lahko začne že pred smrtjo svojca, kar imenujemo pričakovano žalovanje.

Pomaga, če smo do žalujoče osebe empatični in potrpežljivi, ponudimo veliko podpore in razumevanja, aktivno poslušamo in zagotovimo varen prostor, kjer lahko brez obsojanja izrazijo svoja čustva. Strokovni delavci lahko še dodatno pripomoremo h okrevanju, tako da zagotovimo, da so njihova čustva normalna in veljavna ter ne zmanjšujemo njihove izkušnje. Pogosto je smiselno, da jih usmerimo v podporne skupine, opozorimo na gradiva ali na spletne strani z ustrezno vsebino o žalovanju. Spodbudimo svojce k zdravim načinom spoprijemanja z izgubo, kot so na primer izražanje svojih misli in čustev v pogovoru ali s pomočjo pisanja, glasbe in slikanja, z ustrezno skrbjo zase (ustrezen spanec, zdrava prehrana, vaje čuječnosti in telesna vadba), ohranjanja stikov z družino in prijatelji, ki jih podpirajo, ali vključevanja v dejavnosti, ki jim prinašajo tolažbo in dajo njihovem dnevu pomen (deljenje zgodb, gledanje fotografij ali hranjenje majhnega spomina). Med žalovanjem se lahko nekateri posamezniki poslužujejo nezdravih načinov spoprijemanja, kot so izolacija, uživanje psihoaktivnih snovi ali preobremenjenost z delom. Spodbudimo jih, da sprejmejo praktično pomoč od ljudi v svojem okolju, kot so priprava obrokov, opravljanje ali varstvo otrok, saj so lahko vsakdanja opravila v prvih tednih žalovanja prevelika obremenitev za njih. Pri svetovanju in nudenju podpore bodimo občutljivi za različna verska in kulturna prepričanja ter družinske tradicije. Kljub svobodi žalovanja na svoj način, pomanjkanje družbenega sprejemanja in razumevanja različnih procesov žalovanja lahko privede do stigmatizacije in izolacije žalujočega.

Pomembno je, da strokovni delavci poznamo tudi znake zapletenega žalovanja (dolgotrajna intenzivna žalost, ki traja več kot eno leto, težave pri delovanju ali misli na samopoškodovanje), jih prepoznamo in posameznike napotimo h kliničnim psihologom ali psihiatrom.

Ko umre otrok, obstaja večja verjetnost, da bo žalovanje pri svojcih podaljšano in pogosto tudi zapleteno, zato smo pri žalujočih starših še toliko bolj pozorni, da dobijo ustrezno podporo v okolju ali če je potrebno tudi strokovno podporo. Klinični psiholog lahko prepozna individualne lastnosti

v procesu žalovanja, morebitne varovalne in rizične dejavnike ter razlikuje med običajnimi odzivi in podaljšanim ali kompleksnim žalovanjem.

Podpora otrokom in mladostnikom

Razumevanje smrti se z odraščanjem otroka razvija in spreminja. Postopoma do obdobja mladostništva razvija razumevanje, da je smrt neizogibna, univerzalna in dokončna. Pri delu z otroki zato upoštevamo razvojne značilnosti otroka ali mladostnika.

Dojenček koncepta smrti ne razume, zazna pa telesno neugodje in vznemirjenost staršev. Z jokom in nemirom se odzove na čustveno stanje staršev, njihov odhod ali neugodje. Ko je dojenčku neugodno, so možne spremembe spanja in hranjenja.

Malček, torej otrok od 1 do 3 let, ne razume smrti kot trajne in dokončne, pač pa kot začasno in reverzibilno. Pričakuje, da se bo oseba, ki je umrla, vrnila. Podobno kot dojenčki se odzivajo na čustveno stanje staršev, če so le-ti vznemirjeni, so lahko malčki razdražljivi, prisotne so težave s spanjem in hranjenjem, ponovno se pojavijo vedenja, ki jih je malček že prerasel (npr. sesanje, močenje, manj zrel govor). Tako dojenček kot malček potrebuje telesno bližino in nadaljevanje rutine ter zadovoljevanje bioloških potreb.

Mlajši otroci, stari do 5 let, še vedno dojemajo smrt kot začasno in reverzibilno, po približno 6. letu pa postopoma začnejo dojemati, da se oseba ne bo vrnila in da umrejo vsi ljudje, tudi oni sami. Pojavijo se lahko različni strahovi, kot je strah, da bi med spanjem umrli, nočne more, ločitvena tesnoba, apatija, hiperaktivnost, agresivnost. Starše spodbudimo, da nadaljujejo z običajno rutino in vzgojo, saj to otroku daje občutek gotovosti in posledično varnosti.

Otrok postopoma osvaja dokončnost, neizbežnost in univerzalnost smrti. Smrt razume kot nekaj nenaravnega, kot na primer posledico nasilja ali nesreče, ali kot nekaj naravnega, kar se zgodi le starim ljudem. Pogosto je smrt poosebljena, je na primer starka s koso. Še vedno so možne napačne predstave, kot na primer da zbolíš in umreš, če nisi priden. Otroci potrebujejo pogovor o

bolezni in smrti ter odgovore na vprašanja, ki si jih zastavljajo, saj v nasprotnem primeru ostanejo sami s svojim doživljanjem in s premalo podpore. Pri pogovoru o smrti lahko uporabimo otroške knjige, risbe in igro. Kako otroci doživljajo smrt bližnjega, je odvisno tudi od tega, kako o njej govorijo odrasli v njihovi okolici.

Mladostnik tako kot odrasli razume dokončnost, neizbežnost in univerzalnost smrti. Razume, da bo tudi on nekoč umrl. Pri mladostniku smo pozorni na morebitne spremembe v vedenju. Preverjamo njegovo razumevanje, ga spodbujamo k postavljanju vprašanj in izražanju čustev. Pogosto mladostnik svojo stisko zaupa prijateljem.

Zaključek

Čeprav pogrešanje pri večini ljudi nikoli zares ne mine, se posamezniki s časom in podporo naučijo živeti s svojo izgubo. Zdravstveni delavci smo prvi, ki obvestimo svojce o smrti in se z njimi običajno prvi srečamo. Komunikacija s svojci, ki je podporna in upošteva edinstvenost in hkrati univerzalnost žalovanja, lahko pomembno vpliva na potek njihovega žalovanja.

Literatura

- 1 Kübler-Ross E. *On death and dying*. Collier Books/Macmillan Publishing Co. 1970
- 2 Kessler D. *Finding meaning : the sixth stage of grief* (First Scribner trade paperback edition). Scribner. 2019
- 3 Himmelstein BP, Hilden JM, Boldt AM in Weissman D. Pediatric Palliative Care. The New England Journal of Medicine. 2004;350, 1752-62.
- 4 Bluebond-Langner M., DeCicco A. in Nordquest Schwallie M. Children's views of death. V Ann Goldman, Richard Hain, Stephen Liben. Oxford Textbook of Palliative Care for Children. Second Edition. Oxford University Press. 2012
- 5 Jünger S, Payne SA, Costantini A, Kalus C, Werth JL. The EAPC Task Force on Education for Psychologists in Palliative Care . European Journal Palliative Care. 2010 Mar;17(2):84-7.

- 6 Palliative Care for infants, children and young people. The facts. The EAPC Taskforce for Palliative Care in Children in Fondazione Maruzza Lefebvre D'Ovidio Onlus. 2009
- 7 Children's Palliative Care Handbook for GPs, Association for Children's Palliative Care, 2011.

Hemato-onkološki bolnik in prehranska dopolnila – varnost oz. nevarnost?

Sara Kenda

Splošna bolnišnica »dr. Franca Derganca« Nova Gorica

sara.kenda@sbng.si

Uvod

Onkološki bolniki pogosto prejema veliko število zdravil, hemato-onkološki pri tem niso izjema. Za izboljšanje splošnega počutja in obvladovanje neželenih učinkov zdravljenja pogosto iščejo dodatno podporo, zato posegajo po prehranskih dopolnilih. Uporaba prehranskih dopolnil je pri teh bolnikih lahko tvegana, zato je pomembno, da so bolniki in zdravstveni delavci pri tem previdni. Prehranska dopolnila vključujejo vitamine, minerale, rastlinske izvlečke, aminokisline in druge snovi, katerih namen je dopolniti običajno prehrano. Področje prehranskih dopolnil ureja živilska zakonodaja. Na drugi strani so zdravila snovi ali kombinacije snovi, ki so predstavljene z lastnostmi za zdravljenje ali preprečevanje bolezni. Področje zdravil ureja Zakon o zdravilih. Za zdravljenje osnovne bolezni bolniki prejema zdravila, ki imajo tudi neželene učinke. Tveganje za pojav neželenih učinkov se lahko ob sočasnem jemanju drugih zdravil in prehranskih dopolnil še poveča, saj lahko tako zdravila kot prehranska dopolnila dodatno vplivajo na učinek zdravil ali prehranskih dopolnil.

Vloga prehranskih dopolnil pri hemato-onkoloških bolnikih

Prehranska dopolnila lahko imajo pozitiven učinek na bolnike z rakom, če se uporabljajo smiselno in pravilno. Med najpogostejše uporabljenimi dopolnili so vitamini (zlasti vitamin D in B-kompleks), minerali (kot je magnezij), rastlinski izvlečki (npr. kurkuma in ingver) ter probiotiki. Ta dopolnila lahko pripomorejo k izboljšanju kakovosti življenja, obvladovanju neželenih učinkov zdravljenja in krepitvi splošnega zdravja. Imunomodulatorni učinki nekaterih dopolnil, kot so vitamin C in vitamin D, so lahko koristni za krepitev imunskega sistema, ki je pri hemato-onkoloških bolnikih pogosto oslavljen zaradi bolezni ali zdravljenja. Mnogi bolniki se odločijo za prehranska dopolnila,

da bi obvladali neželene učinke kemoterapije ali radioterapije, kot so utrujenost, slabost, pomanjkanje apetita in poškodbe sluznice. Pogosto se uporabljajo omega-3 maščobne kisline in L-glutamin, ki pa v ozadju še nimajo ustreznih raziskav, ki bi njihove dolgoročne učinke potrdile.

Tveganja uporabe prehranskih dopolnil pri hemato-onkoloških bolnikih

Interakcije prehranskih dopolnil z zdravili

Interakcije med zdravili so definirane kot spremenjen učinek zdravila ob sočasni uporabi nekega drugega zdravila, pri čemer se lahko povečajo tako želeni kot neželeni učinki enega ali obeh zdravil. Podobno kot zdravila, lahko na učinek zdravil vplivajo tudi prehranska dopolnila. Pri kemoterapevtikih, imunoterapevtikih in drugih zdravilih za zdravljenje hemato-onkoloških bolnikov je zaradi velikega tveganja za pojav neželenih učinkov to še posebej nevarno. V osnovi ločimo tri tipe interakcij med zdravili: fizikalno-kemijske, farmakokinetične in farmakodinamične. Najpogostejše so farmakokinetične interakcije, pri katerih gre največkrat za vpliv na presnovo zdravila pri čemer je lahko določeno zdravilo ali prehransko dopolnilo inhibitor/zaviralec ali induktor encima, preko katerega se drugo zdravilo ali prehransko dopolnilo presnavlja. Posledica je povišana ali znižana koncentracija zdravila ali prehranskega dopolnila, kar lahko pomeni večje tveganje za pojav neželenih učinkov ali nezadostnega učinka zdravila. Na primer, zdravilo Venetoklaks se v večjem deležu presnavlja preko citokroma P450 CYP3A4, kar pomeni, da na njegove koncentracije lahko vplivajo zdravila ali prehranska dopolnila, ki vplivajo na citokrom P450 CYP3A4. Dokazano je, da sočasno jemanje zaviralca citokroma P450 CYP3A4, ketokonazola, ki sočasno zavira tudi P-glikoprotein (P-gp) znatno poveča maksimalno koncentracijo (C_{max}) Venetoklaksa, kar lahko ima za posledico prekomeren učinek zdravila in posledično povečano tveganje za toksične učinke. Glede na to, da je zaviralec citokroma P450 CYP3A4 tudi grenivka, lahko v primeru jemanja prehranskih dopolnil z grenivko ali pitjem grenivkega soka pričakujemo podoben učinek. Pri zdravilih in prehranskih dopolnilih, ki inducirajo citokrom P450 CYP3A4 (npr. šentjanževka) obratno lahko pride do zmanjšanih koncentracij Venetoklaksa in posledično neučinkovitosti. V manjši meri se preko citokroma P450 CYP3A4 presnavlja tudi bortezomib.

Farmakodinamične interakcije so tiste, pri katerih pride do spremenjenega farmakološkega učinka enega zdravila ob sočasnem jemanju drugega zdravila. Lahko pride do sinergističnega ali antagonističnega učinka. Farmakokinetična interakcija med zdravili in prehranskimi dopolnili je na primer sočasno jemanje visokih odmerkov vitamina C in kemoterapevtikov, pri čemer lahko pride do zmanjšane učinkovitosti kemoterapevtika. Dodatno lahko rastlinski izvlečki, kot je ginko, vplivajo na delovanje zdravil za redčenje krvi.

Neželeni učinki prehranskih dopolnil

Nekatera prehranska dopolnila lahko povzročijo neželene učinke, kot so prebavne težave, alergijske reakcije, spremenjene vrednosti krvnega sladkorja, krvnega tlaka in drugo. Pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom je treba biti še posebej previden pri uporabi rastlinskih dopolnil, saj lahko nekatere rastline, kot je ameriški slamnik, povzročijo neželene imunološke odzive.

Prekomeren vnos hranil

Čeprav je težko doseči toksične ravni vitaminov in mineralov s prehrano, lahko visok vnos prehranskih dopolnil privede do prekomernih količin nekaterih hranil, kar ima lahko negativne posledice. Na primer, prekomerni vnos vitamina A ali vitamina E lahko poveča tveganje za nastanek krvnih strdkov, kar je lahko za hemato-onkološke bolnike zelo nevarno.

Kakovost prehranskih dopolnil

Dejstvo, da so prehranska dopolnila del živilske zakonodaje nam daje vedeti, da so prehranska dopolnila manj regulirana od zdravil. Vprašanje kakovosti je na mestu, zato je smiselno, da uporabljamo prehranska dopolnila pri katerih so opravljeni testi varnosti in čistosti. V primeru, da niso bila testirana lahko vsebujejo škodljive snovi kot so težke kovine, pesticidi ali druge zdravju škodljive snovi. Zaradi vsega napisanega je priporočljivo, da bolniki izberejo izdelke, ki so certificirani in ustrezno nadzorovani.

Zaključek

Uporaba prehranskih dopolnil pri hemato-onkoloških bolnikih je lahko koristna, vendar mora biti terapija ustrezno pregledana s strani strokovnjaka na tem področju. Zdravstveni delavci moramo biti pozorni na morebitne interakcije med zdravili in neželene učinke dopolnil, hkrati pa moramo zagotavljati, da bolniki ne presegajo priporočenih dnevnih odmerkov. Z ustreznim pristopom in previdnostjo se lahko prehranska dopolnila vključijo v celovito obravnavo, ki pripomore k izboljšanju kakovosti življenja hemato-onkoloških bolnikov.

Literatura

- 1 Pravilnik o prehranskih dopolnilih, 2013. Uradni list Republike Slovenije št. 66/13.
- 2 Zakon o zdravilih (ZZdr-2), 2014. Uradni list Republike Slovenije št 17/14.
- 3 Memorial Sloan Kettering Cancer Care, c2025. About Herbs. Botanicals and Other Products [internet]. Dosegljivo na: <https://www.mskcc.org/cancer-care/diagnosis-treatment/symptom-management/integrative-medicine/herbs>
- 4 Norman HA, Butrum RR, Feldman E, Heber D, Nixon D, Picciano MF et al. The role of nutritional supplements in cancer therapy. J Nutr. 2003; 133.
- 5 Grašič Lunar K, Rupnik E, Sever M, Preložnik Zupan I. Nutritional care for patients with hematological malignancy. Zdrav Vest. 2023; 92 (5-6).
- 6 Marian MJ. Dietary Supplements Commonly Used by Cancer Survivors: Are There Any Benefits? NCP. 2017.
- 7 Wolf CPJG, Rachow T, Ernst T, Hochhaus A, Zomorodbakhsch B, Foller S et al. Interactions in cancer treatment considering cancer therapy, concomitant medications, food, herbal medicine and other supplements. J Cancer Res Clin Oncol. 2021; 148:461-473.
- 8 Gougis P, Hilmi M, Geraud A, Mir O, Funck-Brentano C. Potential Cytochrome P450-mediated pharmacokinetic interactions between herbs, food, and dietary supplements and cancer treatments. Crit Rev Oncol Hematol. 2021.

Ali posvečamo dovolj pozornosti simptomom anemije?

Klara Podgoršek

Oddelek za hematologijo in hematološko onkologijo, Univerzitetni klinični center Maribor

klara.podgorsek@ukc-mb.si

Anemija ali slabokrvnost je bolezensko stanje, ki je posledica zmanjšanje celotne količine hemoglobina v telesu. Hemoglobin je krvno barvilo, ki se nahaja v rdečih krvničkah - eritrocitih in omogoča prenos kisika iz pljuč v vsa tkiva ter prenos ogljikovega dioksida iz tkiv v pljuča. Pri zmanjšani količini hemoglobina je v ospredju pomanjkanje kisika, medtem ko izločanje ogljikovega dioksida ni moteno. Anemija je pogosto spregledano zdravstveno stanje, ki lahko bistveno vpliva na kakovost življenja posameznika. Kljub temu da se simptomi, kot so utrujenost, bledica, omotica in zasoplost, pogosto pripisujejo stresu ali hitremu življenjskemu tempu, so lahko znak resnega pomanjkanja železa ali drugih pomembnih hranil. Premalo pozornosti namenjamo zgodnjemu prepoznavanju teh znakov, kar lahko kasneje vodi v resnejše zdravstvene zaplete.

Vzroke za nastanek anemije lahko v grobem razdelimo v dve veliki skupini. Anemija je lahko posledica motene tvorbe hemoglobina ali posledica prevelike izgube ali pospešenega razpada eritrocitov. Motena tvorba hemoglobina je najpogostejše posledica pomanjkanja ne obhodnih snovi, ki so potrebne za nastajanje hemoglobina. Najpomembnejši vzroki za nastanek te vrste anemije je pomanjkanje železa, redkeje pa pomanjkanje vitamina B12 ali pomanjkanje folne kisline. Drugi razlog za moteno tvorbo hemoglobina so kronične okužbe, vnetja, malignomi ali okvara ledvic. Drugo veliko skupino anemij predstavljajo anemije, ki so posledica krvavitve ali prehitrega oziroma prekomernega razpada eritrocitov. Anemija zaradi krvavitve je običajno posledica večjih krvavitev, najpogostejše iz prebavil ali pri ženskah iz rodil in seveda ob poškodbah. V kolikor so krvavitve manjše, in dolgotrajne pa pride do anemije predvsem zaradi pomanjkanja železa.

Bolniki tožijo zaradi hitre utrudljivosti, splošne nemoči, hitrega utripa srca, težke sape, šumenja v ušesih, zaspanosti, otežene koncentracije, prebavnih težav, spolne nemoči ali motenj

menstrualnega ciklusa. Te težave so splošne in prisotne pri vseh vrstah anemije, ne glede na vzrok. Pri pregledu bolnikov z anemijo izstopa bledica kože in sluznic, predvsem ocenjujemo barvo dlani in ustne sluznice, seveda pa barva kože ni odvisna samo od stopnje anemije ampak tudi od prekrvljenosti in debeline kože. Pri pregledu ugotovimo običajno pospešen utrip srca, včasih šum nad srcem. Pri nekaterih vrstah anemije opazimo tudi druge spremembe, na primer zlatenico pri hemolitičnih anemijah. Pri anemijah zaradi primarnih bolezni kostnega mozga lahko opazimo povečane bezgavke, jetra in vranico, po koži pa lahko vidimo krvavitve.

Za diagnozo in opredelitev anemije moramo pri bolniku vedno opraviti laboratorijske preiskave. Osnovna preiskava je hemogram ali krvna slika. Poleg hemograma pogosto opravimo še dodatne laboratorijske preiskave, s katerimi ocenimo stanje železa v organizmu, koncentracijo vitaminov B 12 in folne kisline, potrdimo morebitno okvaro ledvic in jeter, ki sta lahko vzrok anemije. V kolikor z navedenimi preiskavami anemije ne moremo opredeliti ali sumimo na bolezen kostnega mozga, je potrebna tudi punkcija kostnega mozga.

Pri zdravljenju anemije moramo upoštevati vzroke za anemijo, hitrost nastanka in težave, ki jih bolnik ima. Tako je pri bolniku, ki ima anemijo zaradi pomanjkanja železa, potrebno zdravljenje z železom oziroma drugimi manjkajočimi snovmi. Pomembno je ugotoviti vzrok za pomanjkanje železa in ga ustrezno zdraviti. Prav tako lahko vzročno zdravimo večino drugih anemij. Transfuzijsko zdravljenje je potrebno le, če je anemija hude stopnje, če je nastala hitro in ima bolnik zaradi tega resne težave, še zlasti če ima bolnik pridružena tudi druga bolezenska stanja. Pri anemijah, ki so posledica bolezni ali okvare kostnega mozga je potrebno začasno ali včasih trajno transfuzijsko zdravljenje anemij.

Pri anemiji zaradi pomanjkanja železa, ločimo absolutno pomanjkanje železa, ki se nanaša na zmanjšanje celotne količine železa v telesu in funkcionalno pomanjkanje železa, ki se nanaša na nezadostno mobilizacijo železa iz zalog, zaradi povečanih potreb, ob normalnih ali povišanih zalogah železa. Opazimo ga pri kronični anemiji, če pride do aktivacije hepcidina. Glavni vzroki za nastanek anemije zaradi pomanjkanja železa, so nizek vnos železa (nezadosten vnos železa, podhranjenost, vegetarijanci, vegani), malabsorpcija (kronične bolezni npr. kronična vnetna

črevesna bolezen, interakcije s hrano in zdravili, visok hepcidin zaradi vnetja), povečana potreba po železu (hitra rast, nosečnost, krvodajalstvo), izguba krvi (krvavitve iz prebavil, ginekološke krvavitve, krvavitve ob kirurških posegih).

Izkazalo se je, da je vnos vitamina B12 pri vegetarijancih in veganih izjemno nizek, medtem ko vsejedci zaužijejo dnevno do 383 % priporočene dnevne količine vitamina B12, pri vegetarijancih pa so zaužite količine zaradi izključitve mesnih živil izjemno nizke. Prav tako je bilo ugotovljeno pomanjkanje vitamina B12, in sicer 24 % pri vegetarijancih, 78 % pri veganih, pri vsejedcih pa tega pomanjkanja ni. Zaradi slabše biološke razpoložljivosti železa v živilih rastlinskega izvora se pri vegetarijancih priporoča 1,8 krat višji vnos železa kot pri ljudeh, ki se prehranjujejo z mešano prehrano.

Najpogostejši simptomi, ki jih navajajo bolniki so: pomanjkanje energije, nezmožnost opravljanja osnovnih dnevnih opravil, občutek šibkosti in utrujenosti, občutek vrtoglavice, izguba apetita ter občutek žalosti in depresije.

Lestvica utrujenosti FACIT je merilo utrujenosti s 13 točkami, ki ga poročajo bolniki s 7 dnevnim obdobjem priklica. Elementi so ocenjeni na lestvici odgovorov od 0 do 4 s sidri v razponu od "Sploh ne" do "Zelo". Za oceno FACIT utrujenosti se vse postavke seštevajo, da se ustvari enotna ocena utrujenosti z razponom od 0 do 52. Meri utrujenost pri kroničnih bolnikih. Lestvica FACIT-F, vsebuje postavke: izčrpan sem, ves sem slaboten, ravnodušen/otopel sem, utrujen sem, zaradi utrujenosti se le s težavo česar lotim, zaradi utrujenosti le s težavo speljem stvari do konca, imam dovolj moči/energije, zmožen sem opravljati svoje običajne dejavnosti, spati moram tudi podnevi, preutrujen sem, da bi jedel, pri opravljanju svojih običajnih dejavnosti, potrebujem pomoč, muči me, da zaradi utrujenosti ne morem opravljati stvari, ki bi jih rad, zaradi utrujenosti morem omejevati svoje družabne dejavnosti. Povprečni rezultat lestvice FACIT-F v splošni populaciji je bil ocenjen na 44. Interpretacija rezultatov FACIT-F lestvice se opravi na podlagi zbranih točk in njihovega skupnega seštevka. Vsak odgovor na vprašanje je ocenjen na lestvici od 0 do 4, kjer 0 pomeni, zelo visoko utrujenost, 1 pomeni visoko utrujenost, 2 pomeni zmerno utrujenost. 3 pomeni blago utrujenost in 4 pomeni ni utrujenosti. Po izpolnitvi vprašalnika so rezultati sešteti,

da se pridobi skupna točka. Skupna točka na FACIT-F lestvici se giblje med 0 in 52, pri čemer višja številka pomeni manj utrujenosti. Interpretacija skupnega seštevka, 40 do 52: nizka utrujenost, kar pomeni, da oseba čuti le rahlo utrujenost ali jo sploh ne zaznava kot težavo. 30 do 39: zmerna utrujenost, oseba čuti utrujenost, vendar le ta še nima velikega vpliva na vsakodnevne dejavnosti. 20 do 29: visoka utrujenost, oseba se počuti precej utrujena in utrujenost znatno vpliva na njeno vsakodnevno življenje. 0 do 19: zelo visoka utrujenost, utrujenost je izrazita in močno ovira vsakodnevne aktivnosti in kakovost življenja. Te rezultate je potrebno vedno obravnavati skupaj z drugimi diagnostičnimi informacijami in lahko služijo kot pomembno orodje za spremljanje utrujenosti in njenega obvladovanja v različnih zdravstvenih stanjih.

Utrujenost, ki se pojavi po aplikaciji železovih pripravkov

Poznamo pojav, ki je značilen za bolnike, ki so zdravljeni z železovo karboksimaltozo, ko je utrujenost po venozni aplikaciji železa enaka ali se celo poslabša. Pri bolnikih se pojavi zapoznel stranski učinek, pri katerem pride do hipofosfatemije, za katero še ne poznamo zdravljenja saj je rezistentna na zdravljenje s peroralnim in venoznim fosfatom. Hipofosfatemija po zdravljenju z venoznimi pripravki železa je sedaj splošno priznana in se pojavi v prvih dveh tednih po aplikaciji. Fosfat je bistven za metabolizem, mineralizacijo kosti celično strukturo in encimsko funkcijo. Simptomi vključujejo utrujenost, mišično oslabeledost in bolečine v kosteh. Najbolj ogroženi bolniki so bolniki, pri katerih so potrebne ponavljajoče infuzije, s ponavljajočo se izgubo krvi (ženske z močnimi menstrualnimi krvavitvami, hematološki bolniki (Rendu-Osler-Weber sindrom), krvavitve iz prebavil), malabsorptivnimi vzroki (bariatrične operacije, kronična vnetna črevesna bolezen, celiakija). Dodatni dejavniki tveganja: normalna renalna funkcija, resno pomanjkanje železa, nizka telesna teža, nizke izhodne vrednosti fosfata, visoke serumske vrednosti parathormona. Pomembno je prepoznati bolnike z večjo ogroženostjo za hipofosfatemijo, ki se pojavi po zdravljenju, saj je lahko dolgotrajna in zanjo ni standardnega načina zdravljenja.

Vloga medicinske sestre pri bolniku z anemijo zaradi pomanjkanja železa

Ocena bolnikovega stanja, beleženje simptomov (utrujenost, bledica, omotica, glavobol, pospešen srčni utrip), pregled prehranskih navad in življenjskega sloga, spremljanje laboratorijskih izvidov (hemoglobin, feritin, serumsko železo). Ključnega pomena je, da bolnike opolnomočimo z informacijami o prepoznavanju zgodnjih znakov – še posebej ženske z močnimi menstruacijami in bolnike s kronično vnetno črevesno boleznijo. Pomembno je izobraževanje bolnikov, pojasnitev pomena uravnotežene prehrane z živili bogatimi z železom (rdeče meso, jetra, stročnice, zelena listnata zelenjava), razlaga pomena vitamina C za boljšo absorpcijo železa in opozorilo glede vpliva kalcija, čaja in kave na zmanjšano absorpcijo, poučevanje o pravilnem jemanju železovih pripravkov (na prazen želodec ali s sokom bogatim z vitaminom C).

Sodelovanje pri zdravljenju, priprava in spremljanje terapije z železovimi dodatki (peroralno ali intravensko), opazovanje možnih stranskih učinkov zdravljenja (zaprtje, slabost, temno obarvano blato), spodbujanje bolnika k rednim kontrolnim pregledom. Psihosocialna podpora, spodbujanje bolnika k upoštevanju terapije in prilagoditvi življenjskega sloga, svetovanje glede zmanjšanja utrujenosti in prilagajanja dnevnih aktivnosti, podpora pri soočanju s stresom, ki ga lahko povzroči kronična anemija.

Literatura

- 1 Bennett, L. (2024). Fatigue and the IDA patient. *Anaemia day, nurse symposium - highlights*.
- 2 Cairnes, V. (2024). Iron treatment safety considerations. *Anaemia day, nurse symposium - highlights*.
- 3 FACIT - F. (5. marec 2025). Pridobljeno iz areyoutired.eu:
<https://www.areyoutired.eu/sl/pozdravljeni/>
- 4 Fraser, A. (2024). Iron deficiency and fatigue. *Anaemia day, nurse symposium - highlights*.
- 5 Gabrijelčič, G. (2016). *Lakto - ovo način prehranjevanja in vitamin B12*. Izola: Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju.

- 6 Martens, K. L., & Wolf, M. (2023). Incidence, mechanism and consequences of iron . induced hypophosphatemia. *Haematology*, 636 . 639.
- 7 Slapar, M. (2014). *Anemije: vodnik za bolnike* . Mengeš: Društvo bolnikov s krvnimi boleznimi.
- 8 Šetinc, L. (2022). Alternativna prehrana: pregled literature . *Zdravniški vestnik* , 242 - 254
- 9 Van Doren, L., & drugi. (2024). Expert consensus guidelines: Intravenous iron uses, formulations, administration, and management of reactions. *AJH Wiley* .
- 10 Zoller, H., Wagner, S., & Shaefer, B. (2023). What is wrong in doing good? *BJHaem*.

Aplikacija železovih pripravkov

Sladana Lukić

Oddelek za hematologijo in hematološko onkologijo, Univerzitetni klinični center Maribor

sladana.lukic@ukc-mb.si

Železo je mineral, ki ga najdemo v različnih živilih, kot so rdeče meso, perutnina, ribe, fižol, zelenjava in obogatene žitarice. Železo se v človeškem telesu nahaja v obliki hemoglobina (Hb), beljakovine v rdečih krvnih celicah, ki prenaša kisik iz pljuč v vse organe in tkiva. Železo ima v telesu številne pomembne funkcije. Je sestavni del hema, snovi, ki je prisotna med drugim tudi v beljakovinah hemoglobinu in mioglobinu. Ima še vrsto drugih nalog: je del snovi, ki sodelujejo pri proizvodnji energije za delovanje telesa, pri razstrupljanju in presnovi zdravil, deluje kot antioksidant, pomaga imunskemu sistemu uničevati bakterije, sodeluje pri nastajanju genskega materiala, uravnava procese, ki zaznavajo količino kisika v tkivih in posledično pri odgovoru telesa na zmanjšano količino kisika.

Železo kroži v telesu v zaprtem krogu. Ostarele eritrocite fagocitirajo makrofagi v kostnem mozgu, jetrih in vranici. Iz sproščenega Hb se izloči železo, ki se v eritroblastih ponovno uporabi za sintezo Hb. V sistemu recikliranja železa v telesu preko plazme vsak dan potuje 20 do 25 mg železa. Absorpcija in izločanje preko prebavil znaša pri človeku povprečno 1 do 2 mg/dan. Absorpcija železa je odvisna od več dejavnikov. Obratno sorazmerna je z zalogami železa v telesu, pri normalnih zalogah se absorbira približno 10 % zaužitega železa, pri zmanjšanih zalogah 20 do 30 %. Zmanjšana je v primeru pomanjkanja kislosti želodčnega soka. Za homeostazo železa dodatno skrbi še negativni regulator hepcidin.

Sideropenična anemija

Sideropenična anemija nastane postopno. Najprej se porabi uskladiščeno železo, ob tem je koncentracija železa v serumu še normalna, znižana pa je koncentracija serumskega feritina. V naslednjem koraku se zmanjšata koncentracija železa v serumu in zasičenost transferina z železom, šele zatem nastane anemija, ki jo opredelimo z znižanjem plazemske koncentracije Hb.

Pomanjkanje železa se v organizmu odraža kot sideropenična anemija. Zmanjšanje zalog železa vodi v neustrezno sintezo Hb, zato so eritrociti manjši in vsebujejo manj Hb kot normalni. Torej prepoznamo anemijo zaradi pomanjkanja železa kot mikrocitno in hipokromno.

Nadomeščanje železa je pri anemiji zaradi pomanjkanja železa zgolj simptomatski ukrep. Ključno je poiskati vzrok anemije in ga odpraviti. Železo je na tržišču prisotno v oblikah za peroralno in intravensko uporabo. Oblike za muskularno uporabo zaradi številnih neželenih učinkov, predvsem boleče aplikacije, niso več del klinične prakse.

Intravenska infuzija železa je postopek, pri katerem se železo vbrizga neposredno v žilo. To je način dodajanja železa, ki se uporablja, ko se železo zgolj s prehrano ali peroralnimi pripravki ne absorbira dovolj. Pogostost intravenskih infuzij železa ter doza je odvisna od resnosti pomanjkanja železa in posameznikovega zdravstvenega stanja in sodi v domeno zdravnika.

Infuzijske reakcije

Venozna aplikacija preparatov železa spremlja nizko tveganje za preobčutljivostne reakcije.

Pojavnost preobčutljivostnih reakcij (incidenca):

Življenjsko nevarni neželeni učinki pri venoznem apliciranju železa so izredno redki, z ocenjeno pojavnostjo pod 1 na 200.000 odmerkov. Večina neželenih učinkov zdravil, pri parenteralnem dajanju železa, so blage samoomejujoče infuzijske reakcije. Običajno se te reakcije kažejo kot tiščanje v prsih ali hrbtu ter rdečica obraza ali ščemenje v grlu. Blage do zmerne reakcije lahko posnemajo zgodnje simptome anafilaktične reakcije. V nasprotju z anafilaktično reakcijo, simptomi blage do zmerne infuzijske reakcije običajno po prekinitvi aplikacije železa spontano izzvenijo in se običajno ne ponovijo, ko z aplikacijo nadaljujemo.

Prvi znaki infuzijske reakcije so: kašelj, bolnik postaja nemiren, zato priporočamo prisotnost ob bolniku in pogovor z njim. Večina infuzijskih reakcij je blagih s simptomi, kot so zardevanje, tiščanje v prsih, včasih z dispnejo in/ali bolečino v hrbtu. Pogosto se bolnik začetka blagih reakcij niti ne zaveda; za zdravljenje blagih reakcij običajno zadostna začasna prekinitev infundiranja zdravila.

Ekstravazacija železovih pripravkov

Pomembna je preventiva, saj lahko aplikacija železa izven venskega pleteža povzroči trajno obarvanje kože na mestu ekstravazacije. Izogibamo se dajanju železa na pregibih, mesta venske kanile ne prekrivamo s povojem, pred aplikacijo se prepričamo o prehodnosti vene.

Če bolnik toži zaradi bolečine na mestu injiciranja, opazimo prisotnost otekline ali spremembo barve infundiranja nemudoma ustavimo in ocenimo mesto aplikacije. V kolikor ocenimo, da je prišlo do ekstravazacije odklopimo infuzijo, aspiriramo ostanke zdravila iz podkožja in perifernega venskega kanala, ga odstranimo ter na mesto injiciranja položimo hladen obkladek.

Fosfatemija

Pomembno je prepoznati bolnike z večjo ogroženostjo za hipofosfatemijo, ki se lahko pojavi po zdravljenju. Fosfatemija je lahko dolgotrajna in zanjo ni standardnega načina zdravljenja, saj ni odzivna na peroralno in venozno dodajanje fosfatov. Najbolj ogroženi bolniki so tisti, pri katerih so potrebne ponavljajoče se infuzije (s ponavljajočo se izgubo krvi – ženske z močnimi krvavitvami, hematološki bolniki, bolniki s krvavitvijo iz prebavil) ter maloabsorptivnimi vzroki (kronična vnetna črevesna bolezen, celiakija, bariatrične operacije).

Dodajanje vitamina D pred infuzijo železove karboksimaltoze (FCM) ne zmanjša tveganja za hipofosfatemijo. Pri blagi hipofosfatemiji brez drugih simptomov je priporočeno opazovanje.

Dodajanju fosfata se je treba izogibati, saj povečuje paratiroidni hormon in poslabša fosfaturijo, kar na koncu poslabša hipofosfatemijo. Najpomembnejše obvladovanje hipofosfatemije je prenehanje uporabe FCM. Zaradi stalnih varnostnih pomislekov glede FCM ostaja suboptimalna formulacija za infuzijo celotnega odmerka.

Bolnikom je treba svetovati, naj poiščejo zdravniško pomoč, če opazijo vse večjo utrujenost z bolečinami v mišicah in kosteh. Pri bolnikih, ki prejemajo večkratne visoke odmerke ali pri dolgotrajnem zdravljenju in pri bolnikih z obstoječimi dejavniki tveganja za hipofostafemijo, je potrebno spremljati vrednosti fosfatov v serumu. V primeru dolgotrajne hipofosfatemije, je potrebno ovrednotiti zdravljenje s kompleksom železa s karboksimaltozo.

Slabše sodelovanje pri nadomestnem zdravljenju s peroralnim železom zaradi gastrointestinalnih neželenih učinkov je problematično ter pogosto vodi v nezadostno zapolnitev zaloga železa ter poslabšanje pridružene simptomatike. Pomemben je individualen pristop k izbiri zdravila z železom ter odmerjanju. Novejše intravenske oblike železa (npr. železova karboksimaltoza) izkazujejo zelo nizko incidenco resnih neželenih učinkov in so lahko uspešna alternativa peroralnim oblikam železa ob skrbnem upoštevanju priporočenega načina aplikacije.

Literatura

- 1 Bennett, L. (2024). Fatigue and the IDA patient. *Anaemia day, nurse symposium - highlights*.
- 2 Cairnes, V. (2024). Iron treatment safety considerations. *Anaemia day, nurse symposium - highlights*.
- 3 Cleveland, C. (2023). Pridobljeno iz Intravenous Iron Supplementation:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540969/>
- 4 Fraser, A. (2024). Iron deficiency and fatigue. *Anaemia day, nurse symposium - highlights*.
- 5 Healthline. (2023). Pridobljeno iz Iron Infusion: Benefits, Risks, and Side Effects:
<https://www.healthline.com/health/iron-infusion#infusion-vs-injection>
- 6 Moustarah, F. (2024). *Dietary Iron*. Pridobljeno iz
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540969/>

Ukrepanje ob sopojava h med zdravljenjem z bispecifičnimi protitelesi

Klara Šlajpah

Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični Center Ljubljana

klara.slajpah@kclj.si

Bispecifična protitelesa (BsAbs) predstavljajo pomemben korak naprej na področju imunoterapije, zlasti pri zdravljenju hematoloških rakov, kot so diseminirani plazmocitom (DP), akutna limfoblastna levkemija (ALL) in limfomi. Gre za laboratorijsko zasnovane molekule, ki se lahko hkrati vežejo na dve različni tarči. Na eni strani na receptor CD3 na T-limfocitih, na drugi pa na specifični antigen na površini rakave celice. Takšna vezava ustvari most med imunskim sistemom in rakavo celico, kar omogoči neposredno uničenje tumorja in sproži aktivacijo imunskega sistema. Vsako zdravilo ima specifičen ciljni antigen, kar vpliva tako na učinkovitost kot tudi na vrsto in pogostost neželenih učinkov. BsAbs so povezana z edinstvenim profilom toksičnosti, zaradi česar je vloga medicinskih sester pri spremljanju in obvladovanju neželenih učinkov ključnega pomena. V Sloveniji so za zdravljenje DP trenutno na voljo tri BsAbs: teklistamab in elranatamab (anti-BCMA) ter talquetamab (anti-GPRC5D). Od pogostejše uporabljenih BsAbs v hematologiji sta v uporabi še blinatumomab (anti-CD19), ki se uporablja pri bolnikih z rezistentno ali ponovljeno ALL in glofitamab (anti-CD20) za zdravljenje bolnikov s ponovljenim ali rezistentnim velikoceličnim B limfomom.

Sindrom sproščanja citokinov (CRS)

Eden najpogostejših zapletov ob zdravljenju z BsAbs je sindrom sproščanja citokinov (CRS), ki je posledica nenadne in pretirane aktivacije imunskega sistema. Pojavi se pri približno 60 do 70 % bolnikov. Večina primerov CRS je blagih (stopnja 1 ali 2), resnejši (stopnja 3 ali 4) se pojavijo le pri približno 1 % bolnikov. Bolniki pogosto že po prvem odmerku razvijejo povišano telesno temperaturo, mrzlico, pospešen srčni utrip in utrujenost. V hujših primerih se lahko pojavita hipotenzija in hipoksija. CRS se običajno pojavi 26 do 28 ur po odmerjanju in traja 15 do 20 ur.

Medicinske sestre morajo prepoznati prve znake CRS ter izvajati redno spremljanje vitalnih znakov. Za omogočanje zgodnjega ukrepanja ob pojavu CRS se vitalni znaki bolnikov spremljajo pred vsakim odmerkom BsAbs ter 4 do 6 krat dnevno, oziroma pogosteje, če je potrebno; bolniki imajo ob terapiji nameščene elektrode za telemetrijo (tabela 1). Ukrepi za obvladovanje vključujejo natančno klinično spremljanje, podporno zdravljenje (infuzije, kisik, vazopresorji) in po potrebi imunosupresivna zdravila, kot sta tocilizumab ali kortikosteroidi. Pravočasna uporaba tocilizumaba (zaviralca IL-6) in drugih podpornih ukrepov lahko prepreči napredovanje v večorgansko odpoved. Pomembno je poudariti, da so simptomi CRS lahko podobni klinični sliki sepse, zato je potreben temeljit pregled za izključitev infektivnih vzrokov.

Tabela 1: Spremljanje in obvladovanje toksičnosti (CRS – bolnišnično okolje)

Postopek
Merjenje in beleženje vitalnih znakov na 4 ure
Kontinuirano merjenje in beleženje EKG preko telemetrijskega aparata
Spremljanje vnosa in izločanja tekočin (intravensko in peroralno)
Dnevno tehtanje
Dnevno spremljanje hemograma in biokemičnih parametrov
Dvakrat tedensko spremljanje testov hemostaze
CRP med postopnim odmerjanjem in ob prvem odmerku, nato po potrebi
Ocena stopnje CRS vsakih 12 ur oz. ob spremembi kliničnega stanja
Nevrološka ocena z uporabo ICE točkovnika

Nevrološki zapleti – ICANS

Nevrotoksičnost, zlasti sindrom ICANS (sindrom nevrotoksičnosti, povezan z učinkom imunskih celic), je eden od možnih zapletov in se pojavi pri približno 8 % bolnikov, zdravljenih z BsAbs, od tega jih 2 % doživi hujšo obliko (stopnja 3 ali 4). ICANS se lahko kaže kot glavobol, zmedenost,

težave s pisanjem in orientacijo, v hujših primerih pa lahko pride tudi do epileptičnih napadov, kome in povišanega intrakranialnega tlaka. Povprečni čas pojava je 24 do 115 ur po zdravljenju, trajanje pa 16 do 49 ur. Večina primerov je blagih in reverzibilnih. Ključno je, da medicinske sestre pred začetkom zdravljenja opravijo nevrološko oceno bolnika, vključno z uporabo ocenjevalne lestvice ICE (orientacija, poimenovanje, sledenje ukazom, pisanje in pozornost). V primeru padca ICE ocene ali pojava novih nevroloških simptomov je treba nemudoma ukrepati in o tem obvestiti lečečega zdravnika (tabela 2).

Tabela 2: ICANS / Nevrotoksičnost – Spremljanje in ukrepanje

Postopek / Pogoji	Navodilo / Ukrep
Fizični pregled in vitalni znaki	Opraviti dnevno
Nevrološki pregled	Vsake 8–12 ur ali ob klinični spremembi; pogosteje v enoti intenzivne terapije
Zgodnji nevrološki znaki	Oslabljen pozornost, spremenjena budnost, spremembe v jeziku
Ocenjevanje nevrološkega stanja	Uporaba ICE točkovnika
Potreba po enoti intenzivne terapije	Ob napredujoči motnji zavesti, sumu na možganski edem, epileptičnem statusu ali nevrotoksičnosti stopnje 3 ali 4
Obvestiti hematologa	Ob nevrološki ali hemodinamski spremembi ali padcu ICE ocene
Kritični klinični parametri	Frekvenca dihanja pod 10 ali nad 24 vdihov na minuto, dihalna stiska (cianoza, piskanje), sistolični krvni tlak nad 90 mmHg, telesna temperatura nad 38°C

Za zmanjšanje tveganj se uporablja postopno odmerjanje ("step-up" shema), kjer se odmerki zdravila povečuje postopno. Bolniki prejmejo premedikacijo (kortikosteroidi, antihistaminiki,

antipiretiki) in so po vsakem odmerku hospitalizirani 48 ur. Zdravljenje se lahko nadaljuje šele, ko so vsi simptomi CRS, ICANS ali okužb popolnoma odpravljene.

Okužbe in preprečevanje

Ker BsAbs močno oslabijo imunski sistem, so bolniki izpostavljeni večjemu tveganju za okužbe, zlasti virusne, bakterijske in glivične. Zdravljenje lahko povzroči nevtropenijo, hipogamaglobulinemijo ali izčrpanost T-limfocitov, kar poveča tveganje za resne zaplete. Pomembno je, cepljenje bolnikov (proti gripi, pnevmokoku, COVID-19) in da jih poučimo o samonadzoru – predvsem o pomembnosti merjenja telesne temperature in hitrem ukrepanju v primeru povišane telesne temperature.

Kožne, ustne in hematološke toksičnosti

Pri določenih zdravilih, kot je talquetamab, so pogosti tudi neželeni učinki na koži in v ustni votlini, saj je tarčni receptor prisoten tudi v keratiniziranih tkivih. Pojavijo se lahko izpuščaji, luščenje kože, spremembe okusa, suha usta in motnje pri požiranju. Za lajšanje teh simptomov se priporoča uporaba vlažilcev, izpiranje ust in nežna ustna higiena. Poleg tega so pogoste tudi hematološke toksičnosti: nevtropenija, anemija in trombocitopenija. Večina teh stanj je prehodnih, vendar je v akutnih primerih potrebna podpora s transfuzijami.

Vloga medicinske sestre in sodelovanje v timu

Medicinska sestra ima ključno vlogo pri varnem izvajanju zdravljenja z bispecifičnimi protitelesi. Od spremljanja vitalnih funkcij, nevroloških ocen, do svetovanja bolnikom in sodelovanja z zdravniškim timom. Ti ukrepi vplivajo na končni izid zdravljenja. Poleg kliničnih nalog je pomembno tudi izobraževanje bolnikov in njihovih svojcev: kaj lahko pričakujejo, na katere znake morajo biti pozorni in kdaj naj poiščejo pomoč. Priporočljivo je, da bolniki prejmejo osebne kartice z osnovnimi podatki o zdravilu, ki jih lahko predložijo v primeru nujne medicinske oskrbe.

Pogled v prihodnost

Raziskave na področju BsAbs se hitro razvijajo. Poleg bispecifičnih protiteles se v kliničnih preskušanjih pojavljajo že trispecifična in celo tetraspecifična protitelesa, ki ciljajo več tarč hkrati. S tem se odpirajo nova obzorja zdravljenja in hkrati novi izzivi glede varnosti in toksičnosti. Timsko sodelovanje med medicinskimi sestrami, zdravniki, farmacevti in drugimi zdravstvenimi delavci je ključno za uspešno zdravljenje bolnikov z naprednimi oblikami imunoterapije.

Literatura

- 1 Šlajpah K, Fazarinc P. Ukrepanje pri sopojavih ob zdravljenju z bispecifičnimi protitelesi. V: Škerget M, Jovan B, Cukjati M, Čibej H, editors. Zbornik povzetkov april 2024. Podčetrtek: Združenje hematologov Slovenije; 2024.
- 2 Catamero D, Benito PB, Shenoy S, Doyle M, Fowler J, Kobos R, et al. Nursing Considerations for Cytokine Release Syndrome in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Experience with Teclistamab from the MajesTEC-1 Study. *Semin Oncol Nurs.* 2024;40(3).
- 3 Catamero D, Ray C, Purcell K, Leahey S, Esler E, Rogers S, et al. Nursing Considerations for the Clinical Management of Adverse Events Associated with Talquetamab in Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Semin Oncol Nurs.* 2024;40(5):151712.
- 4 Education P. bispecific antibodies nursing process : cytokine release syndrome (CRS) and immune effector cell-associated neurotoxicity (ICANS) Special Considerations Prior to Treatment Cytokine Release Syndrome (CRS) Immune Effector Cell-Associated Neurotoxicity (ICANS). 2024;(August):1–2.

Trombocitopenija in anemija (HLZ)

Primarna imunska trombocitopenija (ITP)

Luka Čemažar

Univerzitetni klinični center Ljubljana

luka.cemazar@kclj.si

Uvod

Primarna imunska trombocitopenija (ITP) je pridobljena avtoimunska motnja, ki vodi v nastanek trombocitopenije (vrednost trombocitov $<100 \times 10^9/L$), ki je po definiciji izolirana. Njena patogeneza še ni v celoti razjasnjena, vendar je povezana z razvojem avtoprotiteles, ki se vežejo na površino trombocitov in pospešujejo njihovo predčasno razgradnjo v vranici ter retikuloendotelijskem sistemu (RES). Pomembno vlogo ima tudi interakcija celic imunskega sistema (makrofagov, dendritičnih celic, B-limfocitov in T-celic) ter njihovih mediatorjev (citokinov) z mikrookoljem kostnega mozga, kar vpliva na megakariocite in vodi v zmanjšano produkcijo trombocitov.

Diagnostika

Zaradi pomanjkanja občutljivih in specifičnih testov, diagnozo postavimo predvsem z izključitvijo drugih (sekundarnih) vzrokov za trombocitopenijo. Pri tem so ključni anamneza, klinični pregled, diferencialna krvna slika ter usmerjene mikrobiološke in serološke preiskave, vključno z diagnostiko sistemskih vezivno-tkivnih obolenj.

Najpogostejši sekundarni vzroki trombocitopenije, povzročene z avtoprotitelesi, so pridružene avtoimunske bolezni, kot so sistemski eritematozni lupus (SLE), revmatoidni artritis, antifosfolipidni sindrom itd. Infekcijskimi povzročitelji najpogosteje povezani z razvojem ITP so virusi HIV, EBV, CMV, HCV in okužba z bakterijo *Helicobacter pylori*. Pomembno je tudi izključiti hemato-onkološka obolenja, kot sta kronična limfocitna levkemija (KLL) in druga limfoproliferativna obolenja. Poleg imunskih vzrokov je treba izključiti tudi ne-imunsko etiologijo nastanka trombocitopenije, vključno z zdravili povzročeno trombocitopenijo, jetrnimi boleznimi

(npr. ciroza z hipersplenizmom), trombotično mikroangiopatijo (TMA), diseminirano intravaskularno koagulacijo (DIK), mielodisplastični sindromom (MDS), prirojenimi trombocitopenijami in amegakariocitno trombocitopenijo

Epidemiologija in klinična slika

Incidenca ITP v Evropi ocenjena na 2.9 na 100.000 prebivalcev, obravnava pa je osredotočena na obvladovanje in preprečevanje hudih krvavitev, pri čemer je cilj ohranjanje števila trombocitov nad $20\text{--}30 \times 10^9/\text{L}$. Glede na čas trajanja jo lahko razdelimo na novo odkrito (<3 mesece), persistentno (3-12 mesecev) ter kronično (>12mesecev). Pri pacientu z značilno klinično sliko opazimo pojav petehij, purpure(»suhe na koži ter »vlažne v ustni sluznici«), ehkimoze in epistakse. Življenjsko ogrožajoče krvavitve v centralno živčni sistem so redke (1.4 %)

Zdravljenje

Začetno zdravljenje, pri novo ugotovljenih bolnikih s ITP, običajno vključuje kortikosteroide. V Sloveniji najpogosteje uporabljamo deksametazon v odmerku 40 mg štiri zaporedne dni, ki ga ponovimo 2-3 krat. Pri deksametazon pričakujemo odziv pri 79 % bolnikov v 14 dneh. Pogosto se kortikosteroidom, v primeru krvavitev, neodzivnosti ali priprave na posege, dodajo humani imunoglobulini (IVIG 1 g/kg za 2 dni), pri čemer je učinek opazen v 1–3 dneh. Glede na smernice (ASH 2019) priporočajo tako imenovani pristop spremljanja »watch and wait« namesto uvedbe kortikosteroidov pri novo ugotovljenih bolnikih, ki imajo vrednost trombocitov $\geq 30 \times 10^9/\text{L}$, so bodisi asimptomatski ali z blagimi kožno-sluzničnimi krvavitvami. Pri tem je treba upoštevati verjetnost za krvavitev, življenjski slog, komorbidnosti, sočasno prejemanje antitrombotične/koagulantne terapije ter nenazadnje pričakovanja bolnikov. Pri bolnikih, ki ne odzivajo na začetno zdravljenje, se v drugi liniji zdravljenja uporabljajo agonisti trombopoetinskega receptorja (TPO-RA), kot so avatrombopag, eltrombopag in romiplostim, ter imunosupresivna terapija (npr. rituksimab, ciklosporin, mikofenolat itd.). V Evropski uniji je odobren tudi fostamatinib (inhibitor SYK), ki ga pa pri nas ne uporabljamo. V primerih neuspeha

medikamentozne terapije je možna kirurška terapija s splenektomijo, vendar se ta v zadnjih letih uporablja vse redkeje

Zaključek

ITP ostaja heterogena in kompleksna motnja, ki zahteva diferenciran pristop k diagnostiki in zdravljenju. Napredek v razumevanju njene patofiziologije je omogočil razvoj ciljnih terapij, kar je prispevalo k izboljšanju kliničnih izidov in kakovosti življenja bolnikov. Kljub tem dosežkom ostajajo izzivi, zlasti pri optimizaciji ravnovesja med učinkovitostjo zdravljenja, neželenimi učinki in obravnavo asimptomatskih posameznikov. Prav tako je ključnega pomena integracija pristopov oskrbe, osredotočenih na bolnika, ki upoštevajo njegove preference in vpliv bolezni na kakovost življenja.

Literatura

1. Neunert C, Terrell DR, Arnold DM, Buchanan G, Cines DB, Cooper N, et al. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia. *Blood Advances*. 2019 Dec 3;3(23):3829–66.
2. Gafter-Gvili A. Current approaches for the diagnosis and management of immune thrombocytopenia. *European Journal of Internal Medicine*. 2023 Feb 1;108:18–24.
3. 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 Mar 12;113(11):2386–93.
4. Cines DB, Bussel JB, Liebman HA, Luning Prak ET. The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood*. 2009 Jun 25;113(26):6511–21.
5. Provan D, Arnold DM, Bussel JB, Chong BH, Cooper N, Gernsheimer T, et al. Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood Adv*. 2019 Nov 26;3(22):3780–817.

Trombocitna protitelesa - klasične imunohematološke preiskave

Primož Rožman

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

primoz.rozman@ztm.si

Trombocitni antigeni

V trombocitni membrani je poleg različnih ubikvitarnih tudi vrsta trombocitno-specifičnih molekul, med katerimi so tudi glikoproteini s trombocitno-specifičnimi bialelnimi antigeni HPA (angl. human platelet antigens). Proti njim in različnim drugim antigenom membrane se lahko tvorijo avto- ali alo-protitelesa (Pt), ki so klinično pomembna v številnih imunskih boleznih.

HPA antigeni so nahajajo na glikoproteinih GPIIb, GPIIIa, GPIb α , GPIb β , GPIa in proteinu CD109, ki se združujejo v komplekse. Trombociti (Tr) izražajo tudi molekule CD109, GPIV (CD36) in GPVI, ki so tudi lahko tarče avto- in alo-protiteles. Večina bolnikov z ITP ima Pt usmerjena proti GPIIb/IIIa (v 60-80 % primerov), v 50 % pa proti kompleksu GPIb/IX/V, pri čemer imajo bolniki z ITP ponavadi protitelesa razreda IgG, usmerjena proti obema glikoproteinoma, v 10-40 % pa le proti enemu. Redkeje so tarče pri ITP tudi GPIa/IIa, GPVI ali GPIV.

Trombociti, na katerih so vezana Pt, postanejo razpoznavni za fagocitozno razgradnjo v vranici in jetrih, 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 kostnem mozgu, ki prav tako izražajo GPIb in GPIIb/IIIa, ter s tem preprečijo nastajanje novih Tr.

Na trombocitni membrani se nahajajo tudi humani levkocitni antigeni I. razreda (HLA-I), v nizkem številu pa so prisotni tudi antigeni krvnih skupin, I, P, in ABO(H).

Trombocitna protitelesa- preiskave

Trombocitna protitelesa nastanejo samo v patoloških primerih. Delimo jih v avto- in aloprotitelesa in prva povzročajo avtoimunske (ITP, HIT, od zdravil odvisna tr-penija), druga pa aloimunske trombocitopenije (FNAIT in neodzivnost na transfuzije trombocitov). Prvi testi za določitev trombocitnih Pt so bili slabo specifični in občutljivi. Kasneje so se razvili zanesljivejši testi, ki se

med seboj razlikujejo predvsem v občutljivosti, pri čemer razlike izvirajo predvsem iz vrst uporabljenih diagnostičnih Pt in testiranih antigenov, prezentacije delov glikoproteinov, števila uporabljenih Tr, itd.

Eden izmed prvih razvitih testov je bil agregacijski test, s katerim so odkrili prvo, trombocitno-specifično Pt, anti-HPA-1a. Okoli leta 1970 so raziskovalci razvili radioimunski test RIA (angl. radioimmunoassay), imunofluorescenčno preiskavo PSIFT (angl. platelet suspension immunofluorescence test; v nadaljevanju PIFT) (1), različico PAIFT (angl. platelet adhesion immunofluorescence test) ter hemaglutinacijski test MPHA (angl. mixed passive hemagglutination). Vsi testi omogočajo zaznavanje bolnikovih Pt, ki se vežejo na panelne donorske Tr (indirektni test), ali pa so le-ta že vezana na Tr bolnika (direktni test). Njihova skupna slabost je v tem, da je včasih težko ločiti med nespecifično vezavo molekul IgG na Fc-receptor v membrani Tr od specifične vezave na avto-antigene.

Med omenjenimi testi se dandanes v azijskih laboratorijih še vedno uporablja test MPHA, po drugih laboratorijih pa presejalni test PIFT. Preiskava PIFT je občutljiva, vendar ne omogoča identifikacije Pt, poleg tega pa tudi ne zazna Pt z nizko avidnostjo ali v nizkem titru, kot npr. Pt anti-HPA-5a/b in anti-HPA-15a/b. Test zazna Pt pri samo okoli 60-80 % bolnikov z ITP, poleg tega pa je rezultat direktnega testa PIFT zaradi nespecifične vezave Pt lahko tudi lažno pozitiven.

Pri metodi PIFT se izolirani trombociti darovalcev ali bolnika inkubirajo s serumom ali plazmo bolnika in v kolikor so prisotna Pt, se le-ta vežejo na trombocitne antigene. Pozitiven rezultat preiskave PIFT predstavljajo kompleksi med bolnikovimi Pt na membrani Tr in s fluorokromom označenimi sekundarnimi Pt, ki jih lahko zaznamo s fluorescenčnim mikroskopom.

Kasneje so raziskovalci za detekcijo Pt razvili teste z uporabo izoliranih glikoproteinov in poliakrilamidne gelske elektroforeze, vendar zaradi denaturacije proteinov tekom postopka ti testi niso zanesljivi. Z uporabo ne ionskih detergentov in glikoproteinsko specifičnih monoklonskih

Pt so razvili nove metode za detekcijo Pt, usmerjenih proti določenim glikoproteinom. Razvili so teste ACE (angl. antigen-capture ELISA; ELISA- enzyme-linked immunosorbent assay), SASPA (angl. simultaneous analysis of specific platelet antibodies), MACE (angl. modified antigen capture ELISA) in test MAIPA (angl. monoclonal antibody immobilization of platelet antigens) kot zlati standard.

Danes mnogo laboratorijev namesto testa MAIPA uporablja tehnično manj zahtevna in časovno krajša komercialna testa PakPlus ELISA (Immucor, Nemčija) ali PakLx oz. test Luminex (Immucor, Nemčija). Testa se izvajata v mikrotitrski plošči ali mikrosferah s predhodno vezanimi antigeni ter analizirata s čitalcem mikrotitrskih plošč ali aparaturo Luminex (Luminex Corporation, ZDA). Najboljšo specifičnost in občutljivost pri zaznavi Pt omogoča test Luminex, čigar prednost je predvsem v tem, da je analiza hitrejša in enostavnejša ter da lahko s t.im. multipleks metodo določimo veliko število imunskih reakcij v enem samem vzorcu. S testom Luminex lahko hkrati zaznamo Pt proti GPIV, GPIIb/IIIa, GPIa/IIa in antigenom HLA-I v serumu preiskovanca.

Kombinacijo Luminex tehnologije in testa MACE nudi test ICFA (angl. immune-complex capture fluorescence analysis), ki je v začetnem delu izvedbe podoben testu MACE. Metoda zahteva panelne Tr darovalcev, vendar v manjših količinah kot pri klasičnih testih.

Za izvedbo vseh direktnih testov je potrebno zagotoviti bolnikove Tr, kar pa je problematično pri hujši trombocitopeniji. Pri indirektnih testih v tehniki PIFT pa potrebujemo darovalce trombocitnega panela, kar podobno predstavlja določeno težavo. Zaradi tega so proizvajalci testov ELISA in MAIPA za antigene kmalu pričeli uporabljati izolirane glikoproteine iz tipiziranih celičnih linij. Ker lahko pri izolaciji glikoproteinov pride do konformacijskih sprememb, zaradi česar so lahko rezultati testov napačni, so raziskovalci razvili rekombinantne glikoproteine, ki jih uporabljajo v testih ELISA ali Luminex.

Drugačno nadgradnjo mikroskopske imunofluorescenčne tehnike PIFT predstavlja pretočna citometrija, ker omogoča avtomatsko določitev trombocitnih Pt v majhnem volumnu krvi in vzorcih z majhnim številom Tr. Vendar je ta metoda izjemno variabilna, čemur so sledile napake ob primerjavi rezultatov pred zdravljenjem in po njem itd.

Fenotipsko in funkcionalno analizo več parametrov hkrati omogoča tudi masna citometrija, pri kateri uporabljajo različne probe (protitelesa, RNA probe itd.), konjugiranje z izotopi težkih kovin, analizo celic z metodo pretočne citometrije in masno spektrometrijo kot metodo detekcije. Z metodo je teoretično mogoče simultano meriti do 100 različnih parametrov, njena slabost pa je, da ne omogoča detekcije granularnosti ali velikosti celic tako kot pretočna citometrija.

Literatura

1. Curtis B, McFarland J. Human platelet antigens—2013. Vox sanguinis. 2014;106(2):93-102.
2. Mititelu A, Onisâi M-C, Roșca A, Vlădăreanu AM. Current Understanding of Immune Thrombocytopenia: A Review of Pathogenesis and Treatment Options. International Journal of Molecular Sciences. 2024;25(4):2163.
3. Porcelijn L, Huiskes E, de Haas M. Progress and development of platelet antibody detection. Transfusion and Apheresis Science. 2020;59(1):102705.
4. Sachs UJ. Diagnosing immune thrombocytopenia. Hämostaseologie. 2019;39(03):250-8.
5. 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.
6. Kiefel V. Platelet antibodies in immune thrombocytopenia and related conditions. Journal of Laboratory Medicine. 2020;44(5):273-84.
7. Matsushashi M, Tsuno NH. Laboratory testing for the diagnosis of immune-mediated thrombocytopenia. Annals of Blood. 2018;3.

Paroksizmalna nočna hemoglobinurija (PNH)

Saša Anžej Doma

Univerzitetni klinični center Ljubljana

sasa.anzej.doma@kclj.si

Paroksizmalna nočna hemoglobinurija (PNH) je s komplementom sprožena hemolitična anemija, ki nastane iz klonske ekspanzije matičnih celic, ki pridobijo somatsko *PIGA* mutacijo. Produkt *PIGA* gena je encim, potreben za biosintezo glikofosfatidilinozitolnih (GPI) sider, ki pripenjajo različne proteine na celično površino. PNH krvne celice imajo pomanjkanje vseh GPI-sidranih proteinov. Pomanjkanje CD55 in CD59, ki sta GPI-sidrana regulatorja komplementa, vodi v s komplementom sproženo hemolizo eritrocitov in nagnjenje k venskim in arterijskim tromboembolizmom.

PIGA mutacije same niso dovolj za klonsko ekspanzijo pri PNH. Pomanjkanje GPI-sider na matičnih celicah vodi do preživetvene prednosti PNH-matičnih celic v primerjavi z normalnimi matičnimi celicami v okolju avtoimunskega odziva. To pojasnjuje, zakaj se PNH pogosto razvije iz pridobljene aplastične anemije (avtoimunske bolezni, ki prizadene hematopoetske matične celice). Tako imunološki pobeg, samostojno ali v povezavi z drugimi somatskimi mutacijami, omogoča klonalno ekspanzijo PNH krvnih celic. Pri bolnikih s PNH so bile ugotovljene tudi mutacije, povezane s klonalno hematopoezo, kot sta *JAK2V617F* in *CALR*, kar pojasnjuje, kako lahko PNH nastane tudi pri bolnikih brez anamneze pridobljene aplastične anemije; pri bolnikih z mielodisplastičnim sindromom (MDS) ali, redkeje, mieloproliferativno neoplazmo. Bolniki pa imajo lahko tudi PNH brez znakov odpovedi kostnega mozga ali citopenij. V tem primeru se domneva, da gre za predhodno subklinično odpoved kostnega mozga ali pa sekundarne proliferativne mutacije znotraj PNH-hematopoetske matične celice spodbujajo ekspanzijo PNH klona.

Študije bolnikov s pozitivnimi rezultati pretočne citometrije za PNH so pokazale, da imajo PNH-kloni bimodalno porazdelitev velikosti, ki je tesno povezana s klinično sliko bolnikov. Približno ena tretjina bolnikov ima "klasično PNH", za katero so značilna izrazita hemoliza, številni simptomi PNH in povečano tveganje za tromboze. Bolniki s klasično PNH imajo povprečno velikost PNH

klona več kot 70 %. Nasprotno pa se dve tretjini PNH klonov pojavljata pri bolnikih s citopenijami in odpovedjo kostnega mozga brez klinične hemolize. Večina bolnikov z odpovedjo kostnega mozga je v veliki meri asimptomatskih glede PNH in ima majhne PNH klone (s povprečno velikostjo klona približno 11 %). Pregled kostnega mozga pokaže hipoplazijo ali mielodisplazijo, ki ustreza kriterijem aplastične anemije ali MDS in variabilnimi znaki hemolize. Obstaja še subklinična oblika PNH, kjer sicer zaznamo PNH klon, v klinični sliki in kostnem mozgu pa ne ugotavljamo pomembnih odklonov, PNH klon je običajno ≤ 20 %.

Incidenca klinično pomembne PNH je ocenjena na 1-10 primerov na milijon prebivalcev, enakomerno prizadene oba spola, mediana starost ob ugotovitvi je 30 let.

Klinična slika bolnikov s PNH je zelo raznolika: lahko so v ospredju znaki anemije (utrujenost, dispneja), hemolize (zlatenica, temno rdečkast urin; hemoliza je izrazitejša ponoči!), tromboze (na neobičajnih mestih; mezenterialne, možganske in kožne vene, redkeje arterijske tromboze) ali nespecifični simptomi, povezani z distonijo gladkih mišic, ki nastane zaradi sproščanja hemoglobina, porabe dušikovega oksida in vazospazmov (bolečine v trebuhu, erektilna disfunkcija, ledvična insuficienca, pljučna hipertenzija). PNH poteka kot kronična intravaskularna hemolitična anemija. Hudo hemolizo lahko sproži okužba, operacija ali transfuzija krvi. Pri PNH v povezavi z aplastično anemijo ali MDS so v ospredju citopenije.

Najpogostejši in najnevarnejši zaplet PNH je tromboza. Nedavne raziskave so pokazale, da sta komplementni in koagulacijski sistem tesno povezana, saj vsak vpliva na aktivnost drugega, npr. trombin sam naj bi aktiviral alternativno pot komplementa. To lahko pojasni del kompleksnosti tromboze pri PNH. Drugi mehanizmi vključujejo aktivacijo trombocitov, toksičnost prostega hemoglobina, izčrpanje dušikovega oksida, odsotnost drugih z GPI- vezanih beljakovin, kot je receptor za urokinazni aktivator plazminogena, in disfunkcija endotelija.

Na PNH torej posumimo pri znakih hemolitične anemije (anemija, povišan indirektni bilirubin, retikulociti in laktatna dehidrogenaza, znižan haptoglobin) z negativnimi Coombsovimi testi. Diagnozo postavimo s pretočno citometrijo, s katero dokažemo zmanjšanje ali izgubo GPI-sidranih beljakovin na krvnih celicah ter določimo velikost PNH populacije krvnih celic. Izvaja se s

fluorescenčno označenimi monoklonskimi protitelesi, ki se vežejo na GPI-sidrane beljakovine (CD59, CD55); večina testov za PNH vključuje FLuorescent AERolysin (FLAER), reagent, pridobljen iz bakterijskega toksina aerolizina, ki se neposredno veže na GPI sidro. Za zanesljivo diagnozo je priporočljivo uporabiti vsaj dva neodvisna reagenta na vsaj dveh celičnih linijah (npr. granulociti in eritrociti), saj različne linije izražajo različne kombinacije GPI-sidrani beljakovin, nekatere beljakovine pa se na celično površino vežejo preko GPI-odvisnih in GPI-neodvisnih mehanizmov. Za natančno oceno velikosti PNH klonalne populacije je treba analizirati tako granulocite kot eritrocite. Testiranje samo eritrocitov lahko podceni velikost PNH populacije, saj imajo PNH eritrociti skrajšano življenjsko dobo in/ali so razredčeni s transfuzijami krvi nebolelih darovalcev. Pri bolnikih s trombocitopenijo, levkopenijo in neustrezno nizko retikulocitozo je potrebno opraviti tudi preiskave kostnega mozga za opredelitev eventuelne sočasne bolezni kostnega mozga.

Klasično PNH zdravimo z inhibitorji komplementa. Preživetje bolnikov pred uporabo teh zdravil je bilo 15-20 let; tromboza je bila glavni razlog smrti. Prvi inhibitor komplementa na tržišču je bil ekulizumab; monoklonsko protitelo, ki blokira terminalno komponento komplementa C5. Inhibicija komplementa z ekulizumabom ima izjemen učinek pri PNH in igra ključno vlogo pri preprečevanju tromboze ter njenem obvladovanju pri tej bolezni. Ravulizumab je prav tako inhibitor C5; ima daljšo razpolovno dobo in omogoča intravensko injiciranje na 8 tednov (ekulizumab na 2 tedna). Kljub rednemu zdravljenju s C5 inhibitorjem včasih prihaja do prebojnih hemoliz s poslabšanjem utrujenosti, bolečin v trebuhu, porastom LDH in potrebe po transfuziji. Vzrok je najpogosteje ekstravaskularna hemoliza.

Novejši inhibitorji komplementa blokirajo alternativno pot komplementa in so učinkoviti pri zaviranju ekstravaskularne in intravaskularne hemolize v mirnem stanju, vendar pa lahko okužba, poškodba ali operacija sprožijo masivno intravaskularno hemolizo. Zaradi kratke razpolovne dobe teh zdravil lahko do prebojne hemolize pride tudi pri zamudi/izpuščenem odmerku. Iptakopan (inhibitor faktorja B) je peroralno zdravilo (jemlje se 2x dnevno), pegcetakoplan (inhibitor komplementa C3) pa se aplicira v podkožje 2-krat tedensko. Preživetje bolnikov s PNH danes je primerljivo s preživetjem ostalih podobno starih oseb. Pomembno pa se je zavedati, da vsi

inhibitorji komplementa lahko povzročijo življenje ogrožujoče okužbe z N.meningitidis in drugimi enkapsuliranimi bakterijami. Zato vse bolnike cepimo proti meningokoku, pnevmokoku in Haemophilus influenzae B.

Literatura

1. Brodsky, R. A., & DeZern, A. E. (2024, November 27). *Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*. In R. A. Larson & A. G. Rosmarin (Eds.), UpToDate. Wolters Kluwer. Retrieved [03,23,2025], from <https://www.uptodate.com/contents/paroxysmal-nocturnal-hemoglobinuria>
2. Hill A, Kelly RJ, Hillmen P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2013;121(25):4985-96
3. Luzzatto L. Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *J Clin Lab Anal*. 2022;36(12):e24770
4. Brodsky RA. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2021;11;137(10):1304-1309
5. Babushok DV. When does a PNH clone have clinical significance? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2021 Dec 10;2021(1):143-152

Imunohematologija (ZTMS)

Vpliv topnih substanc na določitev krvne skupine AB0

Franka Erker, Janja Mrak

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino Ljubljana

janja.mrak@ztm.si

Uvod

Pravilna določitev krvne skupine (KS) AB0 je ključna za varnost transfuzije in transplantacije. Obstaja veliko vzrokov za diskrepantne rezultate ob določitvi KS. Med njimi so šibko izražanje antigenov pri podskupinah, dodatna reaktivnost zaradi protiteles ter tehnične napake. Spremembe v izražanju antigenov AB0 pa so lahko povezane tudi z različnimi bolezenskimi stanji. Mednje štejemo izgubo izražanja antigenov AB0 pri hematoloških boleznih ali izločanje velike količine topne substance AB0 pri solidnih tumorjih. V prispevku bomo predstavili primer razreševanja odstopajočih rezultatov pri določitvi KS AB0 zaradi prebitka topne substance A.

Topna substanca AB0

Antigene krvnoskupinskega sistema AB0 najdemo na površini eritrocitov, trombocitov, na endoteliju, v ledvicah, srcu, črevesju in pljuči. Posamezniki, ki nosijo zapis za gen *FUT2* (imenovan tudi *Se*), lahko izločajo antigene A, B in H v obliki vodotopnih substanc v telesne tekočine, kot so plazma, slina, znoj, mleko in solze. V populaciji je približno 80 % sekretorjev in 20 % ne-sekretorjev. Znani so redki primeri, pri katerih solidni tumorji izločajo veliko količino topne substance AB0. Stanje z visoko koncentracijo topne substance AB0 v plazmi so zasledili pri bolnikih z različnimi karcinomi (karcinom želodca, trebušne slinavke, črevesja, jajčnikov in žolčevodov), pri cistah jajčnika, v redkih primerih pa tudi pri navidezno zdravih preiskovancih. Predvideva se, da v teh primerih pride do prenosa topne substance v kri neposredno iz tumorskih celic, lahko pa tudi posredno preko absorpcije ascitesa v krvni obtok. Visoka koncentracija topne substance v krvi povzroči nevtralizacijo reagentov (anti-A, anti-B in anti-A,B), ki se uporabljajo za določitev KS AB0,

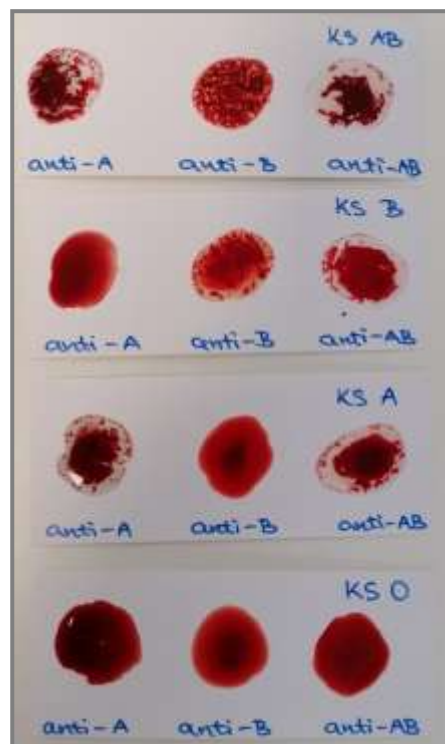
zaradi česar pride do odstopajočih rezultatov pri določitvi KS. Pri posameznih primerih so poročali, da je po resekciji tumorja diskrepanca izzvenela.

Predstavitev primera

Za določitev KS in navzkrižni preizkus smo prejeli vzorec 26-letne pacientke z diagnozami sepsa (iz hemokultur izoliran *Staphylococcus epidermidis*), vneta cista ovarija ter anemija. Po protokolu smo za pacientko določili KS orientacijsko na ploščici s komercialnimi reagenti. Z monoklonskima reagentoma anti-A (Seraclone Anti-A (ABO1), BioRad, Nemčija) in anti-B (Seraclone Anti-B (ABO2), BioRad, Nemčija) ni bilo reakcije, z reagentom anti-AB (Seraclone Anti-AB (ABO3), BioRad, Nemčija) smo zaznali šibke aglutinacije. Določitev KS orientacijsko na ploščici ni bila opredeljiva.

Določitev KS na gelu (DG Gel ABO/Rh (2DVI-) in DG Gel Confirm P, Grifols) je pokazala, da je KS pacientke A, RhD-pozitivna. Reakcija z reagentom anti-A1 (Anti-A1 Lectin, Grifols, Nemčija in Seraclone Anti-A1 (ABO4), BioRad, Nemčija) je bila močno pozitivna (ocenjena jakost reakcije: 4+), z reagentom anti-H (Anti-H Mono-Type, Grifols, Nemčija in Seraclone anti-H (H1), BioRad, Nemčija) pa negativna. Določitev KS smo ponovili tudi iz novega vzorca, rezultati so bili enaki. Določitev KS orientacijsko na ploščici smo ponovili po pranju s fiziološko raztopino (0,9 %) po standardnem operativnem postopku. Reakcija z monoklonskim reagentom anti-A (Seraclone Anti-A (ABO1), BioRad, Nemčija) je bila pozitivna. Naknadno je genotipizacija ABO (PCR-SSP z uporabo komercialnega seta RBC-Ready Gene ABO Subtype, Innotrains Nemčija) pokazala, da je pacientkin genotip 01A1.

Pacientka je v preteklosti že prejela transfuzije eritrocitov. Leta 2012 ji je bila ob operaciji na hrbtenici določena KS A, RhD-pozitivna. Prejela je 6 enot A, RhD-pozitivnih eritrocitov. Takrat pri določitvi KS nismo opažali diskrepantnih rezultatov. Transfuzije eritrocitov so potekale brez težav.



Slika 1: Orientacijska določitev različnih KS na ploščici

Glede na rezultate testiranj smo posumili na nevtralizacijo reagenta anti-A s topno substanco A. Količino substance A smo določili z že opisano metodo po Treacy-u (4).

Monoklonski reagent anti-A (Seraclone Anti-A (ABO1), BioRad, Nemčija) smo titrirali s celicami A2 do jakosti reakcije nižje od 4+, ki smo jo uporabili za testiranje (1:16).

Nadalje smo pripravili redčine plazme preiskovanke in kontrolne plazme (krvodajalec KS A) v fiziološki raztopini po standardnem operativnem postopku (100 μ l plazme in 100 μ l fiziološke raztopine).

Posameznim epruvetam z redčinami plazme smo dodali 100 μ l redčenega monoklonskega reagenta anti-A (1:16) (Seraclone Anti-A (ABO1), BioRad, Nemčija), premešali in inkubirali 30 min na sobni temperaturi.

Na gelske kartice (NaCl, Enzyme test and Cold Agglutinins, DiaMed, Švica) smo dali 50 μ l posamezne redčine plazme preiskovanke ali kontrolne plazme z dodanim monoklonskim reagentom anti-A in dodali 50 μ l 0,8 % suspenzije eritrocitov KS A ter inkubirali 10 min na sobni temperaturi in centrifugirali 10 min na 910 obratih (DiaMed 24S, ID-Centrifuge). Popolna nevtralizacija reagenta anti-A s topno substanco A je bila pri preiskovanki vidna do redčine plazme 1:4096. Pri kontrolni plazmi ni prišlo do inhibicije hemaglutinacije.



Slika 2: Posredno dokazovanje topne substance A v serumu preiskovanke. Popolna nevtralizacija reagenta anti-A s topno substanco je vidna do redčine plazme 1:4096.

Razprava

Pri predstavljenem primeru smo glede na neujemanje med orientacijsko določeno krvno KS na ploščici iz polne krvi, ki je nakazovala na KS 0, ter v preteklosti določeno KS A pri bolnici sprva pomislili, da gre za primer "napačne krvi v epruveti" (angl. *Wrong blood in tube, WBIT*). Pridobili smo nov vzorec pacientke, iz katerega smo dobili enake rezultate testiranja in s tem izključili WBIT. Ker je bila določitev KS na gelu skladna s predhodno določeno KS pri pacientki in ker se pri določitvi KS na gelu pri pripravi suspenzije eritrocitov v diluentu odstrani plazma, smo pomislili, da bi šlo pri bolnici lahko za nevtralizacijo reagenta anti-A s topno substanco A v plazmi. Po pranju eritrocitov in s tem odstranitvijo plazme s topno substanco smo tudi orientacijsko na ploščici določili KS A. S serološkim testiranjem in z genotipizacijo *ABO* smo izključili prisotnost podskupine A. Količino topne substance v plazmi bolnice smo izmerili posredno, in sicer z določitvijo redčine plazme, ki še povzroči nevtralizacijo reagenta anti-A. Popolna nevtralizacija reagenta anti-A s topno substanco A je bila pri preiskovanke vidna do redčine 1:4096. Glede na rezultate smo zaključili, da je odstopajoč rezultat določitve krvne skupine posledica velike koncentracije topne substance A v plazmi preiskovanke. Vir topne substance pa je bila najverjetneje cista jajčnika.

Zaključek

Presežek topne substance *ABO*, ki jo izločajo določeni solidni tumorji, je redek vzrok za diskrepantne rezultate pri določanju KS *ABO*. Pri razreševanju neskladnih rezultatov so pomembni podatki o osnovni bolezni, o predhodno določeni KS in prejemu transfuzij v preteklosti, rezultati seroloških ter rezultati molekularno-bioloških preiskav. Pri bolnikih s presežkom topne substance *ABO* lahko že s pranjem eritrocitov, s katerim odstranimo presežno količino topne substance v plazmi, serološko opredelimo pravo KS. Količino topne substance v plazmi lahko izmerimo posredno z določanjem redčine bolnikove plazme, ki še povzroči nevtralizacijo reagenčnih protiteles. Pravilno določena KS je ključnega pomena za izbor skladnih krvnih komponent, kar predstavlja temelj varnega transfuzijskega zdravljenja.

Literatura

1. Rajeswari S, Balan LG. A closer look into blood group discrepancy arising due to an underlying malignancy. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2016;38(4):361-3.
2. Prakash NP et al. Blood group change in acute myeloid leukemia. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2017;30(1):74–5.
3. Bianco T et al. Loss of red cell A, B, and H antigens is frequent in myeloid malignancies. *BLOOD*. 2001;97(11):3633-9.
4. Treacy M, Gieger J. Substances in Serum Causing Interference with Blood Group Determination. *Transfusion*. 1967;7(6):43-6.
5. Atkinson JB et al. Loss of blood group A in acute leukemia. Morphologic and biochemical studies of red cells. *Transfusion*. 1987;27:45-8.
6. Shafiq M, Karim F. Red cell antigen loss in a patient with chronic myeloid leukemia: A case of ABO discrepancy. *Transfusion and Apheresis Science*. 2014, doi: 10.1016/j.transci.2014.11.004.
7. Hakomori S. Antigen structure and genetic basis of histo-blood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999:247-66.
8. Joshi JR et al. An unusual difficulty in blood grouping due to soluble group substance in a patient's serum. *Indian J Pathol Microbiol*. 1979;223):225-8.
9. Rouger P et al. Plasma blood group changes in gastrointestinal tract carcinoma. *J Clin Pathol*. 1979;32(9):907-11.
10. Hrastar E, Marić I. Razreševanje diskrepantnih rezultatov testiranja v sistemu ABO. *Zbornik povzetkov april 2023*. 192-7.

Pregled obstoječih sistemov krvnih skupin

Matjaž Urbajs

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

matjaz.urbajs@ztm.si

Razvrščanje eritrocitnih antigenov v sisteme krvnih skupin

Z izrazom 'krvna skupina' v transfuzijski medicini pojmuje površinski eritrocitni antigen, ki lahko v posamezniku/posameznici povzroči tvorbo specifičnega protitelesa. Za tovrstne imunske odzive je značilna odsotnost antigena pri osebi, ki aloprotitelo tvori. Ker so številna eritrocitna aloprotitelesa ključnega pomena za varno transfuzijo, je poznavanje eritrocitnih antigenov ter pripadajočih protiteles eno od temeljnih znanj na področju transfuzijske medicine.

Krvne skupine (KS) so dedna znamenja oz. genetični markerji. Glede na biokemične lastnosti in način dedovanja jih lahko razvrščamo v sisteme KS. Kriterije za razvrščanje podaja Mednarodno združenje za transfuzijo krvi (angl. *International Society for Blood Transfusion, ISBT*) in so dostopni na spletnih straneh združenja. V okviru ISBT-ja deluje tudi delovna skupina (DS), ki skrbi za poenoteno, mednarodno sprejeto poimenovanje eritrocitnih antigenov in pripadajočih protiteles (t.i. DS, angl. *working party*, za eritrocitno imunogenetiko in terminologijo krvnih skupin). Novi sistem KS je vzpostavljen, kadar je odkrito vsaj eno eritrocitno aloprotitelo, ki se veže na pripadajoči antigen (običajno je v sistemu poznanih več različnih specifičnosti protiteles proti pripadajočim antigenom), ki ga kodira posamičen genski lokus, ali kompleks dveh, lahko tudi več, tesno povezanih homolognih genov. Novi sistem KS se mora razlikovati od vseh ostalih že poznanih sistemov KS tudi po genu, ki je potreben za nastanek antigenske determinante.

Večina doslej odkritih eritrocitnih antigenov oz. KS že izpolnjuje kriterije za uvrstitev v enega od sistemov. Le manjše število eritrocitnih antigenov še ostaja zunaj sistemov KS: ti eritrocitni antigeni so uvrščeni bodisi v t.i. zbirke krvnih skupin (trenutno uvrščenih 9 eritrocitnih antigenov), ali pa v skupino 'visoko-prevalenčnih' antigenov (angl. *high-prevalence antigens*, '901 series') (trenutno uvrščena 2 eritrocitna antigena: ABTI in LKE) oz. v skupino 'nizko-prevalenčnih'

antigenov (angl. *'low-prevalence' antigens, '700 series'*) (trenutno uvrščenih 16 eritrocitnih antigenov).

Zaenkrat je vseh poznanih eritrocitnih antigenov 393, od katerih je 366 razvrščenih v 47 sistemov KS. Obstoječi sistemi KS so prikazani v tabeli 1, ki prikazuje tudi klinični pomen eritrocitnih protiteles proti antigenom.

Odkrivanje novih sistemov krvnih skupin

Klasični pristop vključuje obsežne serološke preiskave in družinske študije, kar je v preteklosti zahtevalo večletno delo (npr. krvne skupine A, B in O je dr. Karl Landsteiner odkril leta 1900, dedovanje krvnih skupin ABO pa sta uspela dokazati von Dungern in Hirszfeld (še) leta 1910; natančnejši način dedovanja, ki je predpostavljal tri alele, pa je leta 1924 predstavil nemški matematik Felix Bernstein). V današnjem času molekularne metode dopolnjujejo serološke (le-te so z uporabo plazme ali seruma imunizirane osebe še vedno temelj odkritja novega eritrocitnega antigena), kar pomembno pospeši raziskovanje in opredelitev novega sistema krvnih skupin. Sekvenciranje celotnega eksoma (angl. *whole exome sequencing, WES*) omogoča hitrejšo identifikacijo genov, ki nosijo zapis za eritrocitne antigene. Na ta način so leta 2013 identificirali gen *SMIM1*, kar je omogočilo vzpostavitev (tedaj) novega sistema Vel. Uporaba sodobnih molekularnih metod je v letih 2019 do 2021 omogočila opredelitev kar sedem novih sistemov krvnih skupin (Kanno, SID, CTL2, PEL, MAM, EMM in ABCC1). Pri raziskavah so uporabili napredne bioinformatične analize genomskih podatkov, kar je omogočilo identifikacijo skupnih mutacij pri osebah z redkimi fenotipi. S kompleksnim pristopom so razkrili genetsko ozadje eritrocitnega antigena AnWj (Anton), poznane ga že od leta 1972 (eritrocitni antigen je bil do nedavnega uvrščen v serijo 901, s številčno oznako ISBT 901009). Pri raziskavi so izvedli serološka testiranja, pripravili ustrezne knjižnice za izvedbo sekvenciranja naslednje generacije (NGS), opravili genetsko analizo genov *SMYD1* in *CD44H*, sekvencirali gen *MAL* ter analizirali odkrite delecije, izvedli meritve s pretočno citometrijo, izvedli imunobloting proteinov eritrocitne membrane preiskovancev, pripravili DNA konstrukte s sistemom CRISPR/Cas9 in uredili gen *MAL* v celicah BEL-A, čezmerno

izrazili protein Mal v celicah BEL-A ter s konfokalno mikroskopijo preiskali celice BEL-A na izražanje GFP (angl. *green fluorescent protein*). Z zahtevno raziskavo so uspeli dokazati, da je proteolipid Mal (iz angl. *Myelin and Lymphocyte*) nosilec antigenske determinante že dolgo poznane eritrocitnega antigena AnWj ter vzpostavili novi sistem krvnih skupin MAL (s številčno oznako 047).

Zaključek

Razumevanje sistemov krvnih skupin oz. poznavanje eritrocitnih antigenov in pripadajočih protiteles je ključno za varno transfuzijo krvi. Nadaljnji razvoj molekularne biologije in bioinformatike bo nedvomno pripomogel k opredelitvi novih sistemov krvnih skupin, kar bo obogatilo naše znanje o eritrocitni serologiji in, kar je najpomembnejše, doprineslo k varnejši transfuziji.

Tabela 1. Doslej opredeljeni sistemi KS ter klinični pomen eritrocitnih protiteles (Pt). 'Št.': številčna oznaka sistema, 'št. Ag': število poznanih antigenov v sistemu, 'HTR': hemolitična transfuzijska reakcija, 'HBPN': hemolitična bolezen ploda in novorojenčka.

Št.	Ime sistema	Simbol	Ime gena	Št. Ag	HTR/HBPN
001	ABO	ABO	<i>ABO</i>	4	DA/da*
002	MNS	MNS	<i>GYPA, GYPB, (GYPE)</i>	50	da/da
003	P1PK	P1PK	<i>A4GALT</i>	3	da/NE
004	Rh	RH	<i>RHD, RHCE</i>	56	DA/DA
005	Lutheran	LU	<i>BCAM</i>	28	da/NE
006	Kell	KEL	<i>KEL</i>	38	DA/DA
007	Lewis	LE	<i>FUT3</i>	6	ne/NE
008	Duffy	FY	<i>ACKR1</i>	5	DA/da

Št.	Ime sistema	Simbol	Ime gena	Št. Ag	HTR/HBPN
009	Kidd	JK	<i>SLC14A1</i>	3	DA/ne
010	Diego	DI	<i>SLC4A1</i>	23	da/DA
011	Yt	YT	<i>ACHE</i>	6	da/NE
012	Xg	XG	<i>XG,CD99</i>	2	NE/NE
013	Scianna	SC	<i>ERMAP</i>	10	NE/da
014	Dombrock	DO	<i>ART4</i>	10	DA/NE
015	Colton	CO	<i>AQP1</i>	4	DA/DA
016	Landsteiner-Wiener	LW	<i>ICAM4</i>	4	NE/NE
017	Chido/Rodgers	CH/RG	<i>C4A,C4B</i>	9	NE/NE
018	H	H	<i>FUT1; FUT2</i>	1	DA/DA
019	Kx	XK	<i>XK</i>	1	DA/-
020	Gerbich	GE	<i>GYPC</i>	13	DA/DA
021	Cromer	CROM	<i>CD55</i>	20	NE/NE
022	Knops	KN	<i>CR1</i>	13	NE/NE
023	Indian	IN	<i>CD44</i>	6	DA/NE
024	Ok	OK	<i>BSG</i>	3	NE/NE
025	Raph	RAPH	<i>CD151</i>	1	NE/NE
026	John Milton Hagen	JMH	<i>SEMA7A</i>	8	da/NE
027	I	I	<i>GCNT2</i>	1	da/NE
028	Globoside	GLOB	<i>B3GALNT1</i>	3	DA/DA
029	Gill	GIL	<i>AQP3</i>	1	NE/NE

Št.	Ime sistema	Simbol	Ime gena	Št. Ag	HTR/HBPN
030	Rh-associated gly.**	RHAG	<i>RHAG</i>	6	NE/?
031	FORS	FORS	<i>GBGT1</i>	1	NE/NE
032	JR	JR	<i>ABCG2</i>	1	DA/DA
033	LAN	LAN	<i>ABCB6</i>	1	DA/DA
034	Vel	VEL	<i>SMIM1</i>	1	DA/DA
035	CD59	CD59	<i>CD59</i>	1	np/np
036	Augustine	AUG	<i>SLC29A1</i>	4	DA/DA
037	Kanno	KANNO	<i>PRNP</i>	1	np/np
038	SID	SID	<i>B4GALNT2</i>	1	np/np
039	CTL2	CTL2	<i>SLC44A2</i>	5	np/np
040	PEL	PEL	<i>ABCC4</i>	1	da?/ne?
041	MAM	MAM	<i>EMP3</i>	1	da?/DA
042	EMM	EMM	<i>PIGG</i>	1	np/np
043	ABCC1	ABCC1	<i>ABCC1</i>	1	np/np
044	Er	ER	<i>PIEZO1</i>	5	?/DA
045	CD36	CD36	<i>CD36</i>	1	DA/?
046	ATP11C	ATP11C	<i>ATP11C</i>	1	?/?
047	MAL	MAL	<i>MAL</i>	1	?/DA

Legenda: *vrednosti polj v stolpcu 'HTR/HBPN': DA/DA (Pt proti antigenom sistema KS praviloma povzroča HTR in HBPN), da/NE (ne povzročajo vsa Pt HTR oz. je HTR redka; Pt ne povzroča HBPN), np/np (ni podatka glede pomena Pt za pojav HTR in/ali HBPN); ne/NE (Pt praviloma ne povzroča HTR; Pt ne povzroča HBPN); ? (vprašljiv pomen Pt).

Opomba (!): oznake so dokaj arbitrarne – glede kliničnega pomena eritrocitnih aloprotiteles proti posameznim eritrocitnim antigenom glejte priznane strokovne vire; **gly.: glycoprotein.

Literatura

1. Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM, Schwartz J(Y). Technical Manual, 21st edition, Bethesda, AABB, 2023.
2. Denomme GA. Molecular genetic narrative review of the novel blood group systems KANNO, SID, CTL2, PEL, and MAM. Ann Blood 2022;7:30.
3. Tilley LA, Karamatic Crew V, Mankelow TJ, AlSubhi SA, et al. Deletions in the MAL gene result in loss of Mal protein, defining the rare inherited AnWj-negative blood group phenotype. Blood (2024) 144 (26): 2735–2747.
4. <https://www.isbtweb.org/>

Neujemanje orientacijske določitve krvne skupine na ploščici z določitvijo na gelu zaradi Tn antigena

Tina Bobek

Splošna bolnišnica Celje

Uvod

Pravilna določitev krvne skupine (KS) ABO je pomembna pri krvodajalcih, prejemnikih transfuzij in transplantacij ter nosečnicah. Na podlagi prisotnosti oziroma odsotnosti antigenov A in B na površini eritrocitov (direktna KS) ter anti-A, anti-B, anti-A,B protiteles v plazmi (reverzna KS) opredelimo KS A, B, AB ali O. Za določitev se morata direktna in reverzna KS popolnoma ujemati. Ob neskladnih oziroma nejasnih rezultatih sledijo nadaljnji postopki: anamneza (starost, pridružene bolezni, zdravila,...), pregled historičnih podatkov o transfuzijah/transplantacijah v informacijskem sistemu in izvedba dodatnih testiranj s pomočjo seroloških in molekularno bioloških metod. Transfuzija ABO neskladne krvi lahko povzroči takojšen znotrajžilni razpad eritrocitov, transplantacija ABO neskladnih organov lahko vodi v hiperakutno humoralno zavrnitveno reakcijo, ABO neskladje med nosečnico in plodom oziroma novorojenčkom pa do hemolitične bolezni ploda in novorojenca.

V prispevku je opisan primer, kjer smo ugotavljali neujemanje pri določitvi KS ABO z reagenti različnih proizvajalcev. Prisotnost Tn antigena na eritrocitih preiskovanke je povzročila lažno pozitiven rezultat z monoklonalnima reagentoma anti-A ter anti-A,B proizvajalca Diagast.

Primer

Za 69-letno bolnico G.V. smo v dežurni službi 14.4.2022 iz ambulate internistične prve pomoči (IPP) prejeli naročilnico z 2 vzorcema krvi za določitev KS ABO, RhD, K in rezervacijo eritrocitov. Pacientka z znanim srčnim popuščanjem, s pljučno hipertenzijo ter stanjem po pljučni emboliji (I.2021) je bila zaradi epistakse sprejeta na Oddelek za otorinolaringologijo in cervikofacialno

kirurgijo (ORL). Od zdravil je prejela furosemid, spironolakton, dapagliflozin, diazepam in apiksaban.

Po protokolu smo ob sprejemu naročila iz obeh vzorcev določili KS A, RhD poz. (orientacijska določitev na ploščici z reagenti anti-A, anti-B, anti-A,B in anti-D proizvajalca Diagast). Določitev se ni ujela s KS določeno ob odvzemu vzorca na IPP, ki je bila O, RhD poz. (obposteljna določitev KS na kartici Serafol ABO+D proizvajalca BioRad). Po vpogledu v informacijski sistem Datec smo ugotovili, da je imela pacientka dvakrat določeno KS O, RhD poz, K poz. (leta 2010 in 2021). Poklicali smo na ORL oddelek, preverili ujemanje osebnih podatkov ter naročila, prosili za nov vzorec in ponovno obposteljno določitev KS. Na oddelku so ponovno določili KS O, RhD poz. V Transfuzijskem centru smo iz novega vzorca iz polne krvi ter z eritrociti opranimi s fiziološko raztopino in opranimi z diluentom 2 dobili rezultat A, RhD poz. (reagenti proizvajalca Diagast). KS na gelski kartici s humanimi in monoklonalnimi reagenti ter na kartici Serafol ABO+D (oboje od proizvajalca BioRad) je bila O, RhD poz. Hladnih aglutininov nismo zaznali. Predviden fenotip ABO glede na izvid genotipizacije (O1 O1 PCR-SSP) je bila KS O. Sprožili smo postopek reklamacije in o rezultatih nemudoma obvestili proizvajalca Diagast. Po osebni privolitvi pacientke smo jim posredovali nov vzorec krvi za nadaljnja testiranja.

Razprava

Proizvajalec Diagast je v reklamacijskem poročilu potrdil lažno pozitiven rezultat z monoklonalnima reagentoma anti-A in anti-A,B, ki ga je povzročila prisotnost Tn antigena na eritrocitih preiskovanke. Tn antigen so dokazali na podlagi reaktivnosti eritrocitov z Dolichus biflorus lektinom.

In-vitro pridobljena monoklonalna protitelesa, kot so anti-A in anti-A,B, so specifično usmerjena proti določenim epitopom. V primeru anti-A je to terminalni del antigena A (t.j. N-acetilGalaktozamin, GalNAc). Redko lahko pride do navzkrižne reaktivnosti monoklonalnih protiteles z drugimi antigeni s katerimi si delijo podobne epitope. Proizvajalec Diagast v navodilih

za uporabo opozarja na možnost navzkrižne reaktivnosti anti-A in anti-A,B z Tn antigenom. Vzrok je v prisotnosti GalNAc pri antigenu A ter antigenu Tn.

Tn antigeni so t.i. kriptni antigeni, kar pomeni, da so v normalnih okoliščinah našemu telesu skriti. Njihova izpostavitve ob okužbah, rakavih boleznih (adenokarcinomi črevesja, dojk, želodca) in boleznih krvnih celic (levkemija, bolezen kostnega mozga) je posledica somatske mutacije, ki vodi v moten proces glikozilacije glikoproteinov; govorimo o t.i. pridobljeni Tn poliaگلutinaciji. Tn antigeni se izpostavijo na rdečih krvnih celicah, tudi levkocitih in trombocitih, epitelnih celicah površin sluznic (npr. črevesja, pljuč in urinarnega sistema) in rakavih celicah.

Zaključek

Pri testiranju bolnice z znano KS O, RhD poz. smo pri orientacijski določitvi na ploščici pridobili lažno pozitiven rezultat z reagentoma anti-A in anti-AB proizvajalca Diagast. Rezultat je bil ponovljiv iz treh vzorcev. Z reagenti proizvajalca BioRad (kartica Serafol ABO+D, gelski kartici z monoklonalnimi in humanimi reagenti) in z genotipizacijo sistema ABO smo dobili pričakovan rezultat, O RhD poz. Lažno reaktivnost je povzročila prisotnost Tn antigena na eritrocitih preiskovanke.

Šibka podskupina A pri krvodajalcu s hladnimi protitelesi – prikaz primera

Nina Šulek Sisinger, Bojana Bizjak

Center za transfuzijsko medicino Univerzitetni klinični center Maribor

nina.sulek@gmail.com

Uvod

Krvnoskupinski sistem ABO je najpomembnejši v transfuzijski medicini, saj je edini, pri katerem so v serumu posameznika naravno prisotna protitelesa proti manjkajočemu antigenu brez predhodne senzibilizacije s transfuzijo ali nosečnostjo. Ta protitelesa so večinoma razreda IgM, aktivirajo komplement in lahko v primeru transfuzije neskladne krvne skupine (KS) povzročijo takojšen razpad darovalčevih eritrocitov, kar povzroči pri bolniku zelo hudo, lahko smrtno transfuzijsko reakcijo. Tako pri krvodajalcih kot pri prejemnikih transfuzije določamo direktno in reverzno KS ABO. Pri direktni določitvi testiramo eritrocite preiskovanca z reagentoma anti-A in anti-B, z reverzno določitvijo pa ugotavljamo prisotnost protiteles anti-A in anti-B s testiranjem plazme preiskovanca s testnimi eritrociti A₁ in B. V primeru neujemanja med direktno in reverzno določitvijo KS so nujne nadaljnje preiskave, s katerimi razrešimo neskladje in pravilno določimo KS.

Prikaz primera

Pri krvodajalcu s predhodno določeno KS 0, RhD-poz., smo oktobra 2024 pri osmem odvzemu ob rutinski določitvi KS ugotovili šibko reaktivnost eritrocitov z reagentom anti-A na gelski kartici.

Na kartonu krvodajalca je bila vpisana opomba, da »reverzna KS z »A« eri reagira na hladnem«. Ob prvem odvzemu leta 2000 je bila namreč v direktnem delu odsotna reaktivnost z anti-A in anti-B (KS 0), v reverznem delu pa je bila prisotna le reaktivnost z B eritrociti (KS A). Zaradi diskrepance med direktno in reverzno določitvijo KS je bilo opravljeno testiranje v epruveti na hladnem pri 4°C, ki ojača šibke reakcije s protitelesi razreda IgM, kot so anti-A in anti-B. Pri krvodajalcu je bila prisotna reaktivnost tako z A₁ kot tudi B eritrociti, kar je vodilo do napačnega zaključka, da se direktni in reverzni del KS ujemata (KS 0).

Pri vseh nadaljnjih odvzemih je bila odsotna reaktivnost z reagentoma anti-A in anti-B v direktnem delu KS.

Zaradi suma na šibko podskupino A smo tokrat vzorec krvi poslali na ZTM na genotipizacijo ABO. Ta je dokazala prisotnost različice alela A, ki pa je z razpoložljivimi testi ni bilo možno opredeliti. Na ZTM so opravili še dodatna serološka testiranja. Na različnih gelskih karticah so potrdili šibko reaktivnost krvodajalčevih eritrocitov z anti-A in anti-AB, v reverznem delu pa je bila vselej odsotna reaktivnost z eritrociti A₁ in prisotna z eritrociti B (KS A). Pri testiranju z reagentom anti-A₁ ni bilo reaktivnosti, z anti-H pa je bila vidna močna reakcija (3+). Navzkrižni preizkus med eritrociti A₁ in plazmo krvodajalca je bil negativen. Opravili so še adsorpcijo in elucijo, s čemer so jasno prikazali prisotnost antigena A, kar se ujema z reverznim delom določitve KS ABO.

Nato so testirali še krvodajalčevo plazmo za prisotnost hladnih aglutininov. Testiranje je pokazalo, da so pri krvodajalcu prisotni šibko reaktivni hladni aglutinini (titer 2 pri 4°C), ki so bili vzrok za napačno določitev reverzne KS v epruveti ob prvotni določitvi KS leta 2000.

Po opravljenih razširjenih preiskavah smo v CTM Maribor popravili krvodajalčevo KS v IS DATEC v A, RhD-poz in dodali zdravniško opombo. Pogovorili smo se z njim in mu pojasnili posebnosti njegove KS. V del IS DATEC, namenjen preiskovancem, smo vnesli podatke krvodajalca in njegovih potomcev ter staršev s komentarjem o posebnosti KS.

Nato smo preverili, katere komponente smo pripravili iz odvzete krvi in njihov status. Vseh 7 enot koncentriranih eritrocitov (2xKES in 5xKEF) je bilo izdanih na podlagi negativnega navzkrižnega preizkusa z gelsko tehniko (z dodatkom AHG) in transfundiranih. Štiri enote SZP so bile poslane v paketih za predelavo v zdravila iz krvi, 3 enote SZP pa so bile transfundirane. Trombocitni koncentracije so bili pripravljene iz 4 enot (4xTFB) in vsi so bili transfundirani. Preverili smo, kako so potekale transfuzije pri vseh 14 bolnikih, ki so prejeli te krvne komponente in ugotovili, da pri nobenem izmed njih ni prišlo do zapletov.

Razpravljanje

Gen ABO leži na daljšem kraku kromosoma 9 in je sestavljen iz sedmih eksonov in šestih intronov. Ne kodira direktno antigenskih determinant, temveč encim glikoziltransferazo ABO. Ekspresija ABO je kodominantna, na vsakem izmed kromosomov je eden izmed alelov gena: *A*, *B* ali *O*. Gen ABO je zelo polimorfen, z molekularnim testiranjem je bilo prepoznanih že več kot 250 alelov. Za raznolikost genov je odgovornih več različnih molekularnih mehanizmov, najpogostejši med njimi je enojni nukleotidni polimorfizem. Posledica tega so različne ABO podskupine.

ABO podskupine so fenotipi, ki se razlikujejo v količini A in B antigenov prisotnih na eritrocitih in v sekrecijah. Podskupine A so veliko pogostejše kot podskupine B. Najpomembnejši sta A_1 , ki jo ima približno 80 % Evropejcev in A_2 , ki jo ugotavljamo pri približno 20%. Za obe je značilno, da je v direktni določitvi prisotna močna reaktivnost z reagentom anti-A, ločimo pa ju na podlagi reaktivnosti z lektinom *Dolichos biflorus* oziroma reagentom anti- A_1 , ki aglutinira A_1 eritrocite in ne reagira z eritrociti podskupine A_2 .

Preostale šibke podskupine A (npr. A_3 , A_x , A_m in A_{el}), so zelo redke in predstavljajo manj kot 1%. Najpogosteje jih odkrijemo zaradi diskrepance med direktno in reverzno določitvijo krvne skupine. Na eritrocitih teh šibkih podskupin A je zelo nizko število A antigena, zaradi česar je reaktivnost z reagentom anti-A zelo šibka ali celo odsotna. Zaradi večje količine antigena H na teh eritrocitih, je povečana reaktivnost z anti-H lektinom (*Ulex Europaeus*) v primerjavi z A_1 eritrociti, ki z anti-H ne reagirajo.

Klasifikacija šibkih podskupin A temelji na:

- stopnji aglutinacije eritrocitov z monoklonskim (ali poliklonskim) anti-A in anti- A_1 ,
- stopnji aglutinacije eritrocitov s humanim poliklonskim ali nekaterimi monoklonskimi anti-A,B,
- stopnji ekspresije H antigena (reaktivnost z monoklonskim anti-H oziroma lektinom *Ulex Europaeus*),

- prisotnosti oziroma odsotnosti anti-A₁ v serumu,
- sekretorskem statusu (prisotnosti A in H v slini, kar se določa le še redko),
- adsorpciji in eluciji s poliklonskim anti-A,
- družinskih študijah,
- molekularnem testiranju (genotipizacija).

V primeru našega krvodajalca je prišlo do napačne razrešitve diskrepance med direktno in indirektno krvno skupino zaradi hkrati prisotnih hladnih aglutininov, ki so ob testiranju v epruveti na 4°C pokazali reaktivnost tako z A₁ kot tudi B eritrociti. Kot rešitev smo vpeljali dodatno testiranje v epruveti z 0 eritrociti, s čimer lahko ločimo med dejanskimi anti-A₁ in anti-B protitelesi ter hladnimi aglutinini.

Z razširjenim serološkim testiranjem se je jasno prikazalo, da gre za šibko podskupino A, z genotipizacijo ABO (Innotrain, BAGene) pa ni bilo možno opredeliti katera različica alela A je pri krvodajalcu prisotna. Do dokončne opredelitve bi verjetno prišli s sekvenciranjem.

Zaključek

Pravilna določitev krvne skupine ABO tako pri prejemniku kot krvodajalcu je ključna za varnost transfuzije. V primeru kakršnegakoli neskladja med direktno in reverzno določitvijo KS je le-to nujno razrešiti z uporabo razširjenega serološkega in po potrebi tudi molekularnega testiranja. V tem primeru do transfuzijskih reakcij ni prišlo, lahko pa napačna opredelitev šibke podskupine A kot krvne skupine 0 pri krvodajalcih vodi do hemolitičnih transfuzijskih reakcij.

Literatura

1. Olsson ML, Westman JS. ABO and other carbohydrate blood group systems. Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM. AABB Technical Manual. 20th ed. Bethesda: AABB Press;2017 297–328
2. Lahare, Saurabh; Chandrakar, Ramesh; Wasnik, Minal. A case report on weak subgroup of A: Aend. Asian Journal of Transfusion Science 18(2):p 330-332, Jul–Dec 2024.

3. Afroz, Tamanna. Detection of Rare Weaker A Subgroup: Aend. Global Journal of Transfusion Medicine AATM 9(2):p 148-150, Jul–Dec 2024.

Prikaz delovanja nacionalnega registra prostovoljnih nesorodnih darovalcev KMC Slovenija Donor

Sendi Montanič

Zavod RS za transfuzijsko medicino

sendi.montanic@ztm.si

V sedemdesetih letih prejšnjega stoletja je postajala presaditev krvotvornih matičnih celic (KMC) vse bolj uspešen način zdravljenja predvsem levkemij in sorodnih malignih krvnih bolezni. Neskladnost v tkivnih antigenih HLA (Human Leukocyte Antigens) je bila eden izmed poglavitnih razlogov, da veliko bolnikov ni imelo primerne sorodnega darovalca. Zato ne preseneča dejstvo, da so starši dečka Simona Bostica, ki mu je življenje lahko rešila le presaditev KMC, prišli na zamisel, da bi iskali darovalca tudi med nesorodniki. Zdravniki so staršema Londončana Simona povedali, da nihče izmed družinskih članov ni primeren darovalec KMC zanj in da njihov sin lahko preživi le s pomočjo presaditve KMC. Simonova mati Elisabeth je v obupu poiskala pomoč pri medijih, da bi spodbudili možne darovalce. V dveh mesecih se je prijavilo več tisoč ljudi, da bi jih testirali in ugotovili ali so primerni darovalci za Simona. Zgodilo se je neverjetno, eden izmed njih je bil res ustrezen in leta 1973 so v Angliji pri Simonu opravili prvo uspešno presaditev KMC nesorodnega darovalca na svetu. Na podlagi Simonove izkušnje je že naslednje leto v Angliji začel rasti prvi register nesorodnih darovalcev KMC Anthony Nolan Bone Marrow Donors, ki ga je ustanovila mati obolelega Anthony-ja, ki je upala, da bo Simonova izkušnja lahko pomagala tudi Anthony-ju. Postopoma so podobni registri začeli nastajati tudi drugod po svetu. Da bi bolnikom dali čim večjo možnost najti tkivno skladnega darovalca, so se leta 1988 združili v svetovni register BMDW (Bone Marrow Donors Worldwide), danes World Marrow Donor Association (WMDA). Gre za organizacijo, ki vodi zbirko tipov HLA nesorodnih darovalcev in enot popkovnične krvi z vsega sveta in deluje na neprofitni osnovi.

Slovenski register prostovoljnih nesorodnih darovalcev KMC Slovenija Donor (SD) je bil ustanovljen konec leta 1991 na pobudo prof. dr. Mateje Bohinjec v okviru Centra za tipizacijo tkiv

pri Zavodu RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani (ZTM). Leta 1992 je postal polnopravni član svetovnega registra. Na Hematološkem oddelku Univerzitetnega kliničnega Centra (UKC) v Ljubljani so leta 2002 opravili prvo presaditev kostnega mozga nesorodnega darovalca, pri kateri je sodeloval tudi register Slovenija Donor.

Register je doživel svoj razcvet po decembru leta 2004, ko je priznana flavtistka ga. Irena Grafenauer javnosti oznanila, da ima levkemijo in potrebuje presaditev KMC, pri tem pa bi bila največja možnost, da bi zaradi genetskih značilnosti populacije zanjo našli tkivno skladnega darovalca ravno v slovenskem registru. Kasneje so na pobudo bolnikov, njihovih svojcev in organizacij bolnikov na Zavodu za transfuzijsko medicino, transfuzijskih centrih in predvsem organiziranih skupinskih vpisih v lokalnem okolju bolnikov potekale številne velike akcije, ki so pomembno prispevale k širitvi slovenskega registra ter osveščenosti slovenske javnosti o krvnih rakih in pomenu registra SD.

Tako je od ustanovitve registra leta 1991 do leta 2012 število darovalcev v SD rastlo in doseglo 16.000–17.000 članov. To število se je ohranilo do konca leta 2016, ko je prišla pobuda Slovenskega združenja bolnikov z limfomom in levkemijo, da bi s skupnimi močmi zagnali vseslovensko akcijsko kampanjo “DAJ SE NA SEZNAM”. Šlo je za poziv slovenski javnosti k vpisu med potencialne nesorodne darovalce KMC. V okviru projekta smo želeli razširiti register potencialnih darovalcev SD, razbiti tabuje in prepričanja, da je darovanje KMC strašno ter zelo boleče, osvestiti ljudi o preprostosti in varnosti postopka darovanja KMC, ki je napredoval skladno s časom, osvestiti javnost o boleznih, ki jih zdravimo s presaditvijo KMC, zagotoviti dolgoročno rast registra ter spodbuditi altruizem med mlajšimi generacijami. V okviru kampanje se je v register vpisalo skoraj 4000 mladih. Akcija pa je prinesla še eno pomembno spremembo, saj smo postopek vpisa poenostavili tako, da je krvni vzorec, potreben za vpis, zamenjal bris ustne sluznice. V maju 2021 smo akcijo obudili, še dodatno pomladili register in omogočili elektronski vpis v register.

Danes WMDA združuje skoraj 43 milijonov nesorodnih darovalcev in enot popkovnične krvi. Slovenija Donor pa sestavlja več kot 24000 darovalcev in nekaj več kot 300 enot popkovnične krvi.

Za izgradnjo, razvoj in obstoj našega nacionalnega registra je potrebno mnogo interdisciplinarnega sodelovanja, v katerega so vključeni tako strokovnjaki z vseh oddelkov ZTM kot tudi zunanji sodelavci, predvsem s Kliničnega oddelka za Hematologijo UKC, Pediatrične klinike in Slovenija-transplanta (Zavod RS za presaditve organov in tkiv).

Slovenija-transplant je krovna organizacija, ki koordinira vse aktivnosti v zvezi s transplantacijo v RS in zagotavlja tudi širjenje in razvoj registra SD. Register SD financira Ministrstvo za zdravje preko javnega zavoda Slovenija-transplant, javni skladi, sponzorji in ZTM sam s presežkom dohodkov nad odhodki lastnih sredstev. Register SD deluje v skladu s slovensko zakonodajo, ki ureja področje presaditve delov človeškega telesa zaradi zdravljenja ter delovanje nacionalnega programa zdravljenja s presaditvijo KMC. Slovenija Donor je v 5. členu *Pravilnika o načinu delovanja in pogojih za razvoj nacionalnega programa zdravljenja s presaditvijo KMC in načinu delovanja registra nesorodnih darovalcev KMC* imenovan za register nesorodnih darovalcev KMC za območje Republike Slovenije. Navedeno je, da je SD nacionalni donorski in koordinacijski center, ki deluje v skladu z zahtevami, standardi in predpisi mednarodne organizacije za presajanje KMC nesorodnih darovalcev WMDA ter navodili, ki jih za svoje delo oblikuje sam. Sprejema strokovne smernice svojega delovanja, pridobiva čim več novih nesorodnih darovalcev KMC, izvaja promocijo darovanja KMC na nacionalnem nivoju, določa pogoje, ki jih mora izpolnjevati prostovoljni darovalec KMC, določa postopke za zaščito, varstvo osebnih podatkov in zdravstvenega stanja darovalca, usklajuje delovanje vseh strokovnjakov na področju presajanja KMC nesorodnega darovalca, izvaja vse postopke iskanja nesorodnih darovalcev KMC, spremlja darovalce in bolnike po transplantaciji in po potrebi ustrezno ukrepa, določa število in vrsto lokusov ter stopnjo ločljivosti tipizacije HLA darovalcev ob prijavi v register, sodeluje in skrbi za članstvo v WMDA, si prizadeva za akreditacijo WMDA in sodeluje s tujimi registri.

V letu 2024 je register Slovenija Donor posredoval pri 22 opravljenih presaditvah KMC za slovenske bolnike. Pri tem smo 3 ustrezne darovalce našli v domačem in 19 v tujih registrih. Po drugi strani so se 4 izmed 24653 naših darovalcev, ki so bili v letu 2024 preko registra Slovenija Donor vpisani tudi v svetovni register WMDA, izkazali za tkivno skladne in tako primerne darovalce štirim tujim bolnikom. Od leta 2004 do konca leta 2024 je krvotvorne matične celice darovalo 100

članov registra Slovenija Donor za bolnike iz Slovenije, 18 evropskih držav, Izraela, Kanade, ZDA, Avstralije, Brazilije in Argentine.

Iskanje nesorodnega darovalca KMC za slovenske bolnike vedno pričnemo v domačem registru, nadaljujemo pa v WMDA. Iskanje ustreznega darovalca med skoraj 43 milijoni vpisanih v svetovnem registru je lahko hitro ali zelo zapleteno in dolgotrajno. Pri slovenskih bolnikih s tipi HLA, ki se pogosto pojavljajo v populaciji oseb evropskega izvora, je iskanje darovalca navadno zelo hitro. Zapleti pa se pojavijo pri bolnikih z redkim tipom HLA, zato je za uspešno in hitro pot do bolniku ustreznega darovalca medsebojno povezovanje in sodelovanje med registri ključnega pomena. Če pogledamo z zornega kota slovenskih darovalcev, jih je največ (okrog 40%) darovalo ravno za slovenske bolnike. Eden izmed razlogov za to so značilni vzorci tipov HLA, ki jih opazimo v slovenski populaciji. Zato ima naš nacionalni register prav poseben pomen.

Literatura

1. priročnik delovanja registra Slovenija Donor
2. poročilo registra SD za leto 2024

Hemovigilanca

Transfuzija komponente neustrezne kakovosti - krvni strdek v enoti eritrocitov- Predstavitev primera in navodila za postopanje

Anja Rakušček, Aleksandra Bajt, Vesna Galvani

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

anja.rakuscek@ztm.si, aleksandra.bajt@ztm.si

Povzetek

Dne 11. 10. 2024 je prišlo do hudega neželenega dogodka (HND) v SB Izola, ko so pri bolniku ob zamažitvi transfuzijskega sistema opazili strdek v vrečki enote KEF. Na oddelku so prekinili transfuzijo in transfuzijski set s preostankom enote vrnili na CTD Izola. Vzroka za nastanek strdka pri enoti KEF nismo ugotovili. Odvzem polne krvi in predelava sta potekala brez posebnosti in odstopanj. Sistem za odvzem krvi je bil glede na posredne kontrole najverjetneje brezhiben, saj pred vsakim odvzemom polne krvi medicinska sestra po standardnem postopku opravi natančen pregled sistema vrečk. Pred pričetkom predtransfuzijskega testiranja se ponovno opravi pregled enote KEF, prav tako pred izdajo le-te na oddelek, kjer leži pacient, za katerega je bila enota naročena. Če se kadarkoli v procesu odkrije napaka ali odstopanje v vsebini, barvi, konsistenci ali drugem, se tako vrečko odstrani ter pripravi dokumentacijo za reklamacijo/neskladje. Iz opravljenih preiskav nismo uspeli ugotoviti vzroka za dogodek. Posebna pozornost je potrebna pri naslednjem odvzemu pri krvodajalki. Krvodajalka ni prišla na ponovni krvodajalski odvzem tako, da dodatne preiskave pri krvodajalki še niso bile izvedene.

Predstavitev primera

Dne 11. 10. 2024 ob 16:30 so nas iz Urološkega oddelka Splošne bolnišnice Izola (SBI) telefonsko obvestili, da je pri transfuziji enote koncentriranih eritrocitov (KEF) prišlo do "zamažitve" filtra in posledično ni bilo mogoče nadaljevati s transfuzijo. Preostanek enote KEF so skupaj s transfuzijskim sistemom iz oddelka SBI vrnili v Center za transfuzijsko dejavnost (CTD) Izola, saj so opazili, da se je transfuzijski sistem zamažil z večjim krvnim strdkom v enoti KEF. Dežurna

diplomirana medicinska sestra na CTD je po prejemu enote KEF in spremne dokumentacije obvestila dežurnega transfuziologa in vrnjen preostanek komponente krvi ustrezno shranila. Transfuziolog je sprožil postopek odpoklica za vse krvne komponente pripravljene iz odvzema polne krvi. Enota trombocitnega pripravka je bila že predhodno transfundirana. Enota sveže zmrznjene plazme (SZP) je bila poslana v predelavo za izdelavo zdravil iz krvi. Enota KEF je bila informacijsko in kasneje fizično uničena. Po pregledu vrečke smo ugotovili, da je bolnik prejel približno polovico enote KEF. Pri bolniku niso opazili posebnosti, dodatnih enot KEF ni potreboval. Transfundiranje komponente neustrezne kakovosti za bolnika ni imelo negativnih posledic. Preostanek vrečke KEF ni bil poslan za dodatno analizo na Zavod RS za transfuzijsko medicino (ZTM) v Ljubljani. Na CTD Izola smo ponovno pregledali spremljevalno epruveto (interco) vpletene enote KEF in ugotovili, da v epruveti ni prisotnih vidnih krvnih strdkov.

Ob analizi neželenega dogodka je bilo ugotovljeno, da je bil odvzem polne krvi opravljen 17. 9. 2024 na CTD Izola, kjer so pred odvzemom pregledali sistem odvzemnih vrečk in se prepričali o ustrezni vsebnosti antikoagulant. Volumsko odvzem polne krvi ni odstopal, opažali so le počasnejši odvzem. Krvodajalka, ki je darovala enoto KEF, je rojena 4. 9. 1978, polno kri je predhodno darovala 20-krat. V podatkih o krvodajalki razberemo, da je bila dvakrat noseča in dvakrat rodila (2005 in 2010). Občasno ima migrene, ki jih obvladuje z analgetiki. Zaradi zmerno povišanega krvnega tlaka od leta 2020 jemlje amlodipin/ perindopril (Amlessa). V letu 2023 je bila enkrat odklonjena zaradi zmanjšane vrednosti hemoglobina. Glede na list krvodajalke in izpolnjeno anketo krvodajalke dne 17. 9. 2024 nismo opažali posebnosti. Vrednost hemoglobina pred odvzemom je bila 136 g/L, hematokrita 40 %, krvni tlak je bil 135/92 mmHg, pulz 79 utripov/min. Na levi roki je bil po 2 minutah pretok zelo nizek (v vrečki ni bilo niti 30 mL krvi), zato smo odvzem ustavili. Po dogovoru s krvodajalko smo opravili odvzem na desni roki. Odvzem na desni roki je potekal brez zapletov in smo ga uspešno zaključili po 4 minutah in 56 sekundah, kar je znotraj predvidenega časa odvzema. Krvodajalka se je med in po odvzemu dobro počutila. Odvzeto enoto polne krvi smo na dan odvzema z rednim transportom transportirali na ZTM Ljubljana. Transport je trajal 1 uro in 50 minut na temperaturi od 22,0°C do 22,5°C. Centrifugiranje so na Oddelku za predelavo krvi opravili na centrifugi št. 6, avtomatsko ločevanje na Compomat-

u št. 8CQA0155. Enota je bila po standardnem postopku testirana v Centru za testiranje krvi dajalcev. Testiranje je potekalo brez posebnosti, rezultati so bili ustrezni. Iz enote polne krvi so bile pripravljene in sproščene v uporabo 3 krvne komponente (KK), in sicer KEF, SZP in zlitje trombocitnega pripravka. Enota KEF je bila dne 26. 9. 2024 z rednim prevozom poslana iz ZTM Ljubljana v CTD Izola (v ledenico). Enota je bila transportirana od 9:47 do 13:30 pri temperaturi od 8,0° C do 8,5° C. Z enoto KEF smo 11. 10. 2024 opravili predtransfuzijsko testiranje na aparatu za avtomatizirano testiranje, jo izdali za bolnika ter jo na oddelek poslali po cevni zračni pošti, ki jo za pošiljanje KEF in trombocitnih pripravkov iz CTD Izola v SBI uporabljamo od leta 2018.



A)

B)

Slika 1 prikazuje primer krvnega strdka v enoti koncentriranih eritrocitov (KEF); A) sprednja stran vrečke s podatki enote, ki omogočajo popolno sledljivost in B) hrbtna stran vrečke, kjer se jasno vidi notranjost enote in večji strdek v temno rdeči barvi.

V opisanem primeru se je zaobšlo ustaljeno pot kontrole kakovosti ob neskladju. Ostali podatki (odvzem krvi, medicinski vprašalnik, podatki mešalne tehnice, podatki o transportu, predelavi itd.) so bili pridobljeni ter ustrezno zabeleženi.

Navodila za postopanje v primeru transfuzije komponente neustrezne kakovosti

- ✓ Če se neustreznost KK ugotovi na oddelku bolnišnice, **pridobimo v transfuzijski center** enoto KK ali preostanek ter transfuzijski sistem. Izpolnimo obrazec OP-08-P02 *Beleženje, poročanje in odprava neskladnosti*. **Preostanek enote in transfuzijski sistem odpošljemo na ZTM Odseku za končno kontrolo kakovosti krvnih komponent (OKKKKK)**. Enako ravnamo, če neustreznost KK opazimo, ko je enota še na zalogi na ZTM/CTD/BKB.
- ✓ Ko gre za enoto KK, ki je bila sproščena za uporabo, izpolnimo obrazec OP-10-P02 *Odpoklic, krvi in komponent krvi* (vzrok kontrola kakovosti). **Še neizdane KK istega odvzema zadržimo v karanteni do razjasnitve vzroka.**
- ✓ Na OKKKKK opravijo biokemijsko in mikrobiološko analizo poslane enote ter pripadajočih KK. Zaposijo za podatke iz ostalih procesov preskrbe s krvjo. Celotna analiza poleg biokemijske in mikrobiološke analize KK zajema podatke o krvodajalcu, odvzemu, transportu, predelavi, shranjevanju in morebitnem ponovnem transportu enote KK.
- ✓ V primeru izdaje in transfuzije neustrezne KK osebje ZTM/CTD/BKB pridobi podatke o prejemniku KK, transportu in dogajanju ob/po transfuziji KK na oddelku.
- ✓ Po zaključeni analizi OKKKKK pripravi Poročilo za neskladje ob dodatni kontroli kakovosti krvnih komponent.
- ✓ Če je bolnik prejel KK neustrezne kakovosti, je potrebno obvestiti Službo za hemovigilanco na hemovigilanca@ztm.si (SOP-H.K-01 *Obravnava neželenih reakcij pri prejemnikih krvi, neželenih reakcij po darovanju krvi ter neželenih dogodkov* in SOP-H.K-01-P01 *Neskladja šifrant*: B Transfundirana komponenta ne ustreza zahtevam, B6 Neustrezna kakovost komponente). Služba za hemovigilanco po presoji poroča o **hudem neželenem dogodku** Javni agenciji za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP).

Zaključek

V primeru pojava krvnega strdka v enoti KEF ali drugega neobičajnega pojava v zvezi s kakovostjo KK je potrebno preostanek enote KK in transfuzijski sistem poslati na ZTM Odseku za končno kontrolo kakovosti krvnih komponent (OKKKKK), kjer se opravi biokemijska in mikrobiološka analiza poslane enote ter ostalih KK iz istega odvzema polne krvi. OKKKKK zaprosi tudi ostale službe ZTM za dopolnitev podatkov. Celotna analiza poleg biokemijske in mikrobiološke analize KK tako zajema podatke o krvodajalcu, odvzemu, transportu, predelavi (in pridobljenih KK), shranjevanju, morebitnem ponovnem transportu, izdaji in dogajanju na oddelku v zvezi s KK, kjer se je pojavilo odstopanje. Poročilo o dogodku pripravi OKKKKK. Ob ugotovitvi KK neustrezne kakovosti je potrebno odpoklicati preostale KK odvzema in v primeru, da je bolnik prejel enoto neustrezne kakovosti, obvestiti tudi Službo za hemovigilanco.

Mikrobiološka kontrola trombocitnih pripravkov za transfuzijo – pomen, izvajanje in ukrepanje ob pozitivnih rezultatih

Boštjan Smrekar

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

bostjan.smrekar@ztm.si

Uvod

Trombocitni pripravki so zaradi svojega načina shranjevanja – pri sobni temperaturi (20 – 24 °C) s stalnim stresanjem – idealno gojišče za razmnoževanje mikroorganizmov, če so ti prisotni. Mikrobiološka kontaminacija trombocitov je zato ena najresnejših nevarnosti v transfuzijski medicini, saj lahko privede do hudih transfuzijskih reakcij. Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani (ZTM) izvajamo rutinsko mikrobiološko kontrolo trombocitov pred patogensko inaktivacijo. Mikrobiološka kontrola ni le orodje za neposredno zagotavljanje varnosti trombocitov, temveč tudi indikator kakovosti celotnega postopka – od odvzema krvi do obdelave in shranjevanja komponent. Nizka pojavnost pozitivnih rezultatov kaže na učinkovitost postopkov in higieno pri odvzemih in predelavi. V primerih, ko se pozitiven rezultat potrdi, pa izsledki analize pomagajo pri iskanju možnih točk kontaminacije in izboljšanju procesov.

Mikrobiološka kontaminacija trombocitov lahko privede do hudih transfuzijskih reakcij, vključno s septičnim šokom in smrtjo prejemnika. Kljub strogim postopkom pri odvzemu krvi, pripravi komponent in njihovem shranjevanju, obstaja majhna, a ne zanemarljiva verjetnost vnosa patogenov, zato je mikrobiološka kontrola ključni del zagotavljanja varnosti transfuzijskega zdravljenja.

Na ZTM testiramo pripravke trombocitov iz zlitij (trombocitno-levkocitna plast) in pripravke trombocitov, zbranih s postopkom afereze na celičnih ločevalcih. Namen tega nadzora je preveriti ustreznost celotnega postopka priprave krvnih komponent – od odvzema krvi, oziroma trombocitov pri darovalcu, prek procesa obdelave (centrifugiranje, filtriranje, pretakanje v nove sisteme) in skladiščenja, do nastanka končnega produkta. Vse testirane enote so nato patogensko

inaktivirane, pri čemer mikrobiološka kontrola služi kot dodaten kontrolni mehanizem za odkrivanje morebitnih napak v procesu ali prisotnosti mikroorganizmov, ki bi lahko ogrozili varnost bolnikov.

V določenih primerih, predvsem zaradi urgentnih potreb v bolnišnicah in pomanjkanja antigensko skladnih enot na ZTM, se trombocite izda brez patogenske inaktivacije. V takih primerih je mikrobiološka kontrola še posebej pomembna. Vse ne-inaktivirane enote, ki jih izdamo, morajo biti pred izdajo na kliniko vzorčene za mikrobiološko testiranje, saj predstavljajo večje tveganje za morebitni prenos okužb. Na željo naročnika lahko patogensko ne-inaktivirane trombocite pred izdajo obsevamo z X-žarki. Postopek traja le nekaj minut in omogoča inaktivacijo limfocitov, s čimer preprečimo bolezen presadka proti gostitelju. Čeprav obsevanje ne uniči bakterij ali virusov kot patogenska inaktivacija, predstavlja pomemben korak za večjo varnost prejemnika v urgentnih primerih.

Mikrobiološka testiranja trombocitov izvajamo s sistemom Bactec (Becton Dickinson), ki omogoča avtomatizirano odkrivanje prisotnosti mikroorganizmov preko merjenja sprememb v vsebnosti ogljikovega dioksida (CO_2), ki je posledice mikrobne presnove. Za vsak testiran pripravek uporabimo aerobno in anaerobno stekleničko, kar omogoča odkrivanje tako obligatnih aerobov kot tudi anaerobov, ki bi lahko povzročili transfuzijsko okužbo.

Po inokulaciji vzorcev v gojišča sledi 7-dnevna inkubacija v napravi Bactec. Ključno obdobje za odkrivanje klinično pomembnih patogenov pa je prvih 6 ur po začetku inkubacije. Če sistem v tem obdobju zazna pozitiven signal (rast mikroorganizmov), to pomeni, da je bila v vzorcu prisotna dovolj velika začetna koncentracija bakterij, kar je značilno za patogene, ki bi lahko povzročili hude klinične zaplete pri prejemniku, kot sta sepsa ali smrt. Zato je nujno, da je odziv na tovrstne zgodnje alarme hiter in skladen s protokolom.

Na ZTM imamo vzpostavljen protokol za ukrepanje ob pozitivnem rezultatu mikrobiološke kontrole trombocitov. Sistem Bactec deluje 24 ur na dan, vse alarme redno spremlja strokovno osebje. Ob zaznavi pozitivnega signala najprej preverimo, za katero vrsto krvnega pripravka gre – ali gre za trombocite, matične celice ali drugo. Če gre za trombocitni pripravek, se enota

nemudoma umakne iz proizvodnje, s čimer preprečimo njeno distribucijo in morebitno transfuzijo pri bolniku. Nadalje se sproži dodatna mikrobiološka analiza za potrditev kontaminacije in identifikacijo povzročitelja, kar je pomembno tudi za morebitno sledenje izvora kontaminacije.

Pomembno je poudariti, da mikrobiološka kontrola ni le orodje za neposredno zagotavljanje varnosti trombocitov, temveč tudi indikator kakovosti celotnega postopka – od odvzema krvi do obdelave in shranjevanja komponent. Nizka pojavnost pozitivnih rezultatov kaže na učinkovitost postopkov in higieno pri odvzemih in predelavi. V primerih, ko se pozitiven rezultat potrdi, pa izsledki analize pomagajo pri iskanju možnih točk kontaminacije in izboljšanju procesov.

Naša dosedanja praksa kaže, da je kontaminacija trombocitov redka. Ker so posledice v primeru transfuzije kontaminiranih trombocitov lahko zelo hude, ostaja mikrobiološka kontrola – skupaj s patogensko inaktivacijo – ključni element zagotavljanja varnosti transfuzijskega zdravljenja.

Opis primera bakterijske kontaminacije trombocitov – januar 2025

V januarju 2025 smo obravnavali primer, ko se je sprožil alarm zaradi zaznane rasti mikroorganizmov v enem trombocitnem pripravku. Alarm se je sprožil izven rednega delovnega časa, v petek popoldan. Na Oddelku za preskrbo s krvjo so ukrepali v skladu s predpisanim protokolom in obvestili dežurnega inženirja ter zdravnika na Oddelku za diagnostične storitve. Po potrditvi, da gre dejansko za pripravek trombocitov, so o dogodku obvestili tudi zaposlene Odseka za končno kontrolo krvnih komponent, ki so se nemudoma vrnili na delovno mesto in izvedli vse predpisane postopke v skladu s protokolom za kontaminirane trombocite.

Ugotovljeno je bilo, da pripravek trombocitov še ni bil izdan, zato je bil takoj umaknjen v karanteno. Zaradi časovne omejitve (petek popoldan) dodatnih ukrepov takrat še nismo izvajali. V ponedeljek smo pozitivna gojišča poslali v Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) za identifikacijo povzročitelja. Istočasno smo kontaminiran pripravek trombocitov ponovno vzorčili in inokulirali v gojišča, da bi preverili, če je postopek patogene inaktivacije ustrezno deloval. Trombocite, ki jih mikrobiološko testiramo, vedno vzorčimo pred patogensko

inaktivacijo, saj želimo preveriti pravilni postopek odvzema in predelave polne krvi do končnih pripravkov. Rezultat testiranja je bil negativen.

Preko informacijskega sistema smo identificirali vse enote polne krvi, iz katerih je bilo pripravljeno zlitje trombocitov, saj smo želeli preveriti tudi druge komponente, pridobljene iz morebitno kontaminiranega pripravka. Ugotovljeno je bilo, da je bilo zlitje pripravljeno iz enot petih krvodajalcev. Vse enote sveže zamrznjene plazme (SZP) in štiri enote koncentriranih eritrocitov (KEF) so bile še vedno na zalogi na ZTM. Ena enota KEF pa je bila čez vikend izdana na kliniko.

Ker v tistem trenutku še ni bilo znano, katera enota polne krvi je bila vir kontaminacije, je zdravnik transfuziolog preventivno obvestil lečečega zdravnika na kliniki o možnosti, da je bila pacientu transfundirana kontaminirana enota KEF, in priporočil spremljanje bolnikovega kliničnega stanja.

Vse preostale komponente (KEF in SZP), povezane s sumljivimi enotami, smo umaknili v karanteno, dokler ne bi bila potrjena mikrobiološka ustreznost. Vse razpoložljive enote KEF smo mikrobiološko testirali, da bi preverili morebitno prisotnost mikroorganizmov. Enote, ki so že bile izdane, nismo mogli testirati, zato smo namesto tega inokulirali SZP, pripravljeno iz iste enote polne krvi.

Iz NLZOH Novo mesto smo prejeli delni izvid identifikacije povzročitelja. V obeh gojiščih (aerobnem in anaerobnem) so bile prisotne grampozitivni koki v gručah. Identifikacija z metodo MALDI-TOF je v obeh primerih potrdila prisotnost *Staphylococcus saccharolyticus*.

Pregled strokovne literature je pokazal, da koagulazno negativni stafilokoki (CoNS), vključno z *S. saccharolyticus*, sodijo med najpogostejše povzročitelje bakterijske okužbe trombocitnih pripravkov. Gre za običajne anaerobne bakterije kože, ki se lahko v pripravek vnesejo že med odvzemom krvi. Čeprav *S. saccharolyticus* običajno ne doseže klinično pomembnih koncentracij pri standardnih pogojih shranjevanja trombocitov (v prisotnosti kisika), pa njegova klinična pomembnost ni zanemarljiva. Znano je, da lahko v bolnišničnem okolju tvori biofilme in povzroča resne okužbe, kot je endokarditis. Študije so pokazale, da se lahko uspešno pritrdi na plastično embalažo za shranjevanje trombocitov in tam tvori biofilme. Tudi nizke koncentracije bakterij,

prisotne v biofilmu, lahko predstavljajo tveganje za bolnika, saj biofilmi povečujejo virulentnost mikroorganizmov ter njihovo odpornost na antibiotike in imunski sistem. Obstaja bojazen, da lahko transfuzija celo majhnih količin bakterij v obliki biofilmov povzroči neprepoznane transfuzijske reakcije.

Naslednji dan se je ponovno sprožil alarm na aparatu za mikrobiološko kontrolo (Bactec), tokrat pri eni enoti KEF, kjer je bila prav tako potrjena rast mikroorganizmov. Gojišča so bila nemudoma poslana v NLZOH, kjer je bil ponovno identificiran isti povzročitelj – *Staphylococcus saccharolyticus*.

Na podlagi teh rezultatov smo uspeli identificirati točno določeno enoto polne krvi, ki je bila vir kontaminacije. Vse krvne komponente, pripravljene iz te enote, so bile takoj umaknjene iz prometa in poslane v uničenje. Kasneje je bilo potrjeno, da enota KEF, ki je bila izdana na kliniko, ni bila pripravljena iz kontaminirane polne krvi in je bila mikrobiološko ustrezna, kar smo tudi sporočili lečečemu zdravniku.

Zaradi bojazni, da dogodek mogoče ni sporadičen in da bi lahko obstajala sistemska napaka v celotnem procesu priprave trombocitov, smo podvojili obseg mikrobiološkega testiranja trombocitov, pripravljenih z zlitjem. Če bi šlo za sistemsko napako, bi s povečanim obsegom mikrobiološkega testiranja identificirali še kakšno kontaminirano krvno komponento.

Odrejena je bila temeljita analiza celotnega procesa – od izbire krvodajalca, odvzema krvi, predelave v krvne komponente, shranjevanja do izdaje komponent. Analiza je pokazala, da je do kontaminacije najverjetneje prišlo zaradi nepravilno pripravljenega mesta venepunkcije. Temeljito čiščenje in razkuževanje mesta vboda z ustrezno antiseptično raztopino je ključno za zagotavljanje aseptičnih pogojev in zmanjševanje tveganja za kontaminacijo.

Sprejeti korektivni ukrepi

Na podlagi ugotovitev smo pripravili korektivne ukrepe za preprečevanje ponovitve takšnega dogodka. Primer kontaminacije se je zgodil prvič, zato smo iz izkušnje pridobili dragocena znanja in spoznanja.

Vsi zaposleni, ki izvajajo odvzeme krvi, so bili ponovno seznanjeni z navodili za ustrezno pripravo mesta venepunkcije. Posodobljena je bila programska oprema na mešalnih tehnicah, ki zdaj vključuje 30-sekundno odštevanje časa za razkuževanje, kar izvajalcu pomaga zagotoviti ustrezen čas nanosa razkužila. Po tem sledi dodatnih 30 sekund, namenjenih delovanju in sušenju razkužila na koži.

Po razkuževanju se mesta venepunkcije ne sme več dotikati. Če je potrebno ponovno preveriti žilo, se to opravi nad predvidenim mestom vboda.

Na Odseku za končno kontrolo kakovosti krvnih komponent smo posodobili protokol za primer pozitivne mikrobiološke kontrole trombocitov. Po novem se v primeru suma na kontaminacijo odpokličejo vse komponente, pripravljene iz iste enote polne krvi (trombociti, KEF in SZP). Prejšnja različica protokola je predvidevala zgolj odpoklic trombocitov.

Zaključek

Mikrobiološka kontrola trombocitov ostaja pomemben element zagotavljanja varnosti krvnih komponent, kljub uvedbi postopka patogene inaktivacije. Ta sicer pomembno zmanjšuje tveganje prenosa okužbe s trombociti, vendar ne more popolnoma izključiti prisotnosti vseh mikroorganizmov. Opisan primer poudarja, da je kombinacija skrbno izvedenih postopkov odvzema, predelave v krvne komponente in mikrobiološke kontrole, ter hitrega odziva ob pozitivnih rezultatih, nujna za učinkovito preprečevanje prenosljivih okužb s transfuzijo in zagotavljanje varnosti bolnikov.

Literatura

1. Kumaran D, Kalab B, Rood I G H, Korte D, Ramirez-Arcos S. Adhesion of anaerobic bacteria to platelet containers. Vox Sang. 2014
2. Prax M, Debes L, Chudy M, Filomena A, Pisani G, Pupella S, et al. Implementation of a blood proficiency testing scheme for bacterial screening of platelet components. Vox Sang. 2025.

Transfuzijska obravnava TRALI

Aleksandra Bajt, Sendi Montanič, Marjeta Maček Kvanka

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

aleksandra.bajt@ztm.si

Uvod

Po 30 letih raziskav so leta 1985 opredelili in s terminom ***s transfuzijo povezana akutna okvara pljuč (angl. Transfusion-Related Acute Lung Injury, TRALI)*** poimenovali sindrom akutne dihalne stiske po transfuziji. Za TRALI je značilen pojav dihalne stiske in hipoksemije ter pljučnega edema med ali v 6 urah po transfuziji krvnih komponent (KK) ali zdravil iz krvi, ki vsebujejo plazmo. Spremljata ga hipotenzija in povišana telesna temperatura. S slikovno diagnostiko potrdimo prisotnost obojestranskih infiltratov pljuč. Pri TRALI pride do aktiviranja imunskega sistema, ki povzroči najprej povečanje prepustnosti bazalnih membran endotelija mikroobtoka pljučnih mešičkov in nato s kopičenjem tekočine v njih nastanek pljučnega edema. Skupaj s transfuzijo povezano volumsko preobremenitvijo (*angl. Transfusion-Associated Circulatory Overload, TACO*) in s transfuzijo povezano dispnejo (*angl. Transfusion-Associated Dyspnea, TAD*) se TRALI uvršča med *primarne* respiracijske transfuzijske reakcije, pri katerih je osrednje dogajanje v samih pljučih in se kažejo z respiracijskimi simptomi in znaki. Incidenca TRALI je ocenjena na 1:10.000 transfuzij, smrtnost na 5 – 10 %, še pred desetletjem pa je bil najpogostejši vzrok za s transfuzijo povezano umrljivostjo.

Klinična slika in definicija

TRALI je vrsta sindroma akutne dihalne stiske (*angl. Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS*), ki se kaže s povišano telesno temperaturo, mrzlico, dispnejo, cianozo, hipoksemijo, hipotenzijo in

novonastalim obojestranskim pljučnim edemom. Možni sta prehodni nevtropenija ali levkopenija. Klinična slika se razvije med ali v 6 urah po transfuziji, običajno pa v 1 – 2 urah.

Za dokazovanje TRALI ni na voljo specifičnega laboratorijskega testa, zato je diagnoza klinična in temelji na merilih, kot so prisotnost ali odsotnost dejavnikov tveganja za ARDS in ali je bila klinična slika pri bolniku v 12 urah pred nastopom NTR nespremenjena. Leta 2019 sprejeta **nova definicija Vlaarja in sod.** TRALI razdeli v dve skupini: TRALI tip I in TRALI tip II.

TRALI tip I (bolniki brez dejavnikov tveganja za ARDS):

- akutna dihalna stiska;
- ii. hipoksemija ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$ ali $\text{SpO}_2 < 90 \%$);
- iii. s slikovno diagnostiko potrjen obojestranski pljučni edem (t.i. bela pljuča);
- iv. brez hipertenzije levega preddvora, če pa je le-ta prisotna, ni najpomembnejši vzrok za hipoksemijo;
- nastanek simptomov med ali v 6 urah po transfuziji;
- obenem ni dejavnikov tveganja za ARDS.

TRALI tip II (bolniki, ki imajo dejavnike tveganja za ARDS (brez te diagnoze) ali imajo blag ARDS ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \sim 200 - 300 \text{ mmHg}$), pri katerem pride do poslabšanja zaradi transfuzije:

- enako kot pri TRALI tip I;
- stabilna klinična slika 12 ur pred transfuzijo.

Dejavnike tveganja za ARDS delimo na neposredne, kot so pljučnica, aspiracija želodčne vsebine, inhalacijska poškodba, kontuzija pljuč ipd. ter posredne, kot so sepsa, politravma, pankreatitis, hude opekline, nekardiogeni šok ipd.

Diferencialna diagnoza

Akutna dihalna stiska med ali po transfuziji je lahko posledica ene od treh *primarnih* respiracijskih NTR: TACO, TRALI in 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 ARDS ali pa poslabšanje srčnega popuščanja. TACO in TRALI sta lahko prisotna sočasno. Pri bolnikih z dejavniki tveganja za TACO lahko hitra transfuzija in/ali veliki volumni transfundiranih KK privedejo med ali v 12 urah po transfuziji do akutne dihalne stiske in/ali akutnega kardiogenega pljučnega edema. Kažeta se z naslednjimi simptomi in znaki: dispneja, tahipneja, cianoza, hipoksemija, tahikardija, hipertenzija, ortopneja, čezmerno polnjene vratne vene, hiter porast telesne mase in periferni edemi. Pri avskultiranju pljuč in srca lahko slišimo inspiratorne poke in tretji srčni ton. Na RTG posnetku prsnih organov lahko vidimo povečano srčno senco in difuzne infiltrate v pljučih, z UZ srca pa potrdimo sistolno in/ali diastolno srčno disfunkcijo. V laboratorijskih izvidih bolnikov s TACO sta običajno povišana označevalca srčnega popuščanja BNP in NT-proBNP. Nenazadnje tudi uspeh diuretične terapije potrdi diagnozo TACO. Za diagnozo TAD pa se odločimo tedaj, ko se dispneja pojavi do 24 ur po koncu transfuzije in niso izpolnjeni kriteriji za nobeno od prej navedenih NTR.

Epidemiologija in dejavniki tveganja

TRALI je redek, a hud zaplet transfuzijskega zdravljenja. Incidenca 1:10.000 transfuzij je zaradi zahtevnega prepoznavanja sindroma, nedosledne uporabe standardnih definicij in raznolikih načinov poročanja hemovigilančnim službam verjetno podcenjena. Pri 80 % bolnikov s TRALI, ki so pravočasno in ustrezno zdravljeni, se stanje izboljša v 48 – 96 urah, pri preostalih 20 % pa gre za hud klinični potek, ki se velikokrat konča s smrtjo. Smrtnost znaša 5 – 10 %. TRALI je bil še pred desetletjem najpogostejši vzrok za s transfuzijo povezano umrljivostjo, po uspešni uvedbi ukrepov za zmanjševanje incidence pa je to mesto prevzel TACO.

Dejavnike tveganja (DT) za TRALI predstavljajo na eni strani bolnikovo zdravstveno stanje pred transfuzijo in na drugi strani samo transfuzijsko zdravljenje. Kakršenkoli razlog za vnetje pri bolniku z visokimi vrednostmi citokina IL-8 je neodvisni DT za TRALI. Najbolj ogroženi so kritično bolni in poškodovani bolniki. DT za TRALI in ARDS so še: sepsa, nekardiogeni šok, masivna transfuzija, umetno predihavanje, sindrom odvisnosti od alkohola, kajenje, višja starost, pozitivna bilanca tekočin, hematološki malignomi itd. Bolniki po politravmi in operacijah na srcu imajo lahko hkrati prisotnih več DT, veliko število transfundiranih enot KK pa je vzrok za večjo pojavnost TRALI pri bolniki po gastrointestinalnih krvavitvah, operacijah abdominalne aorte, poporodnih krvavitvah, transplantacijah matičnih celic in po zdravljenju trombotične mikroangiopatije. DT na strani transfuzijskega zdravljenja prav tako vključujejo večje število transfundiranih enot v 6 urah pred nastopom TRALI, predvsem na račun prisotnosti bodisi močnih protiteles anti-HLA II. razreda bodisi večjega volumna plazme s protitelesi, ki vežejo granulocite. Dobro znan DT so transfuzije plazme darovalk, ker je po nosečnostih večja verjetnost, da vsebujejo protitelesa anti-HLA. Večje tveganje za pojav TRALI predstavljajo protitelesa anti-HLA II. razreda in protitelesa anti-HNA, protitelesa anti-HLA I. razreda pa redko in le če imajo visok MFI (*angl.* Mean Fluorescence Intensity), aglutinirajo nevtrofilce *in vitro* ter so prisotna v zadostni koncentraciji.

Patofiziologija

Hipoteza 'dveh dogodkov' (*angl.* Two-Hit Hypothesis) razlaga nastanek TRALI kot sosledje vsaj dveh neodvisnih kliničnih dogodkov. Prvi se nanaša na klinično stanje bolnika. DT za TRALI, kot so akutna okužba, stanje po operaciji, hude opekline, zdravljenje s citokini ipd. lahko sprožijo aktivacijo pljučnega endotelija s sproščanjem citokinov. Sledi zbiranje in pritrdjanje na aktivacijo pripravljenih nevtrofilcev v pljučnem endoteliju. Drugi dogodek je transfuzija KK z darovalčevimi protitelesi anti-HLA/anti-HNA, usmerjenimi proti antigenom na površini nevtrofilcev. Darovalčeva protitelesa ali pa biološko aktivne snovi (*angl.* Biologic Response Modifiers, BRMs) v KK nato aktivirajo zbrane nevtrofilce, ki povzročijo poškodbo endotelija. Povečanje prepustnosti bazalnih membran endotelija mikroobtoka povzroči prehajanje eksudata, z beljakovinami bogate tekočine

v pljučne mešičke in s tem nastanek pljučnega edema. *Hipoteza 'dveh dogodkov'* pojasni, zakaj ne pride do TRALI pri vseh prejemnikih KK darovalcev s protitelesi anti-HLA/anti-HNA, pa tudi zakaj se TRALI lahko pojavi v odsotnosti darovalčevih protiteles. Nedavno so prvotno hipotezo dopolnili z ***modelom praga (angl. Threshold Model)***. Do TRALI namreč lahko pride tudi brez prvega kliničnega dogodka v primerih, ko je drugi dogodek dovolj močan. Transfuzija protiteles anti-HLA II. razreda z visokim MFI > 1500 lahko povzroči TRALI pri zdravih preiskovancih. *Model praga* torej pojasni, zakaj je TRALI mogoče opaziti tudi pri bolnikih, ki so bili pred transfuzijo brez DT zanj.

Glede na etiologijo nastanka delimo TRALI na imunski TRALI (> 80 %) in neimunski TRALI. Pri prvem transfuzija darovalčevih protiteles anti-HLA/anti-HNA aktivira bolnikove nevtrofilce, le redko obratno. Pri neimunskem TRALI povzroči aktivacijo bolnikovih nevtrofilcev transfuzija BRMs, ki nastajajo pri daljšem hranjenju KK.

Laboratorijska diagnostika

Laboratorijska obravnava vseh primerov suma na TRALI v Sloveniji poteka centralizirano na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (ZTM). Pri tem postopamo skladno s strokovnimi priporočili Delovne skupine za granulocitno imunobiologijo pri Mednarodnem združenju za transfuzijsko medicino (*angl.* International Society of Blood Transfusion, ISBT).

Pri prejemnikih in darovalcih KK, transfundiranih znotraj 6 ur pred pojavom dihalne stiske, rutinsko ugotavljamo prisotnost levkocitnih protiteles, usmerjenih proti antigenom HLA I. in II. razreda (*angl.* Human Leucocyte Antigen, HLA) ter antigenom HNA (*angl.* Human Neutrophil Antigen, HNA). Protitelesa specifičnosti anti-HLA se ugotavlja na Centru za tipizacijo tkiv (CTT), protitelesa anti-HNA pa v Centru za imunohematologijo (CIH). Serološke in po potrebi genskomolekularne teste pri bolnikih/prejemnikih izvedemo iz svežih potransfuzijskih in/ali predtransfuzijskih vzorcev, za vpletene krvodajalce pa na ZTM večinoma uporabimo vzorce iz Arhiva zamrznjenih vzorcev krvodajalcev oz. vzorce, prejete iz drugih transfuzijskih centrov.

Nevtrofilna protitelesa anti-HNA ugotavljamo s priporočeno kombinacijo seroloških testov, granulocitnega imunofluorescenčnega testa (GIFT) in granulocitnega aglutinacijskega testa (GAT), ki je bolj občutljiv za klinično pomembne aglutinine specifičnosti anti-HNA-3a/b. Za oba granulocitna testa osamimo granulocite darovalcev, tipiziranih v antigenih HNA-1abc, HNA-2a in HNA-3ab, tik pred izvedbo testov. Rezultate za GIFT vrednotimo s pretočnim citometrom, pri čemer ugotavljamo nevtrofilna protitelesa razredov IgG in IgM, rezultate GAT pa odčitamo s faznokontrastnim mikroskopom.

Leta 2020 smo dodatno uvedli rutinsko testiranje s komercialnim testom LabScreen MULTI, ki se izvaja na CTT. Test temelji na Luminex tehnologiji in omogoča sočasno ugotavljanje prisotnosti protiteles IgG anti-HLA I. in II. razreda ter prisotnosti in specifičnosti protiteles anti-HNA. Vzorce, pri katerih določimo prisotnost protiteles anti-HLA I. in/ali II. razreda, testiramo še s testom LabScreen Single Antigen, ki omogoča specifikacijo protiteles anti-HLA. V kolikor v vzorcih krvodajalcev določimo specifična protitelesa anti-HLA oz. anti-HNA, izvedemo gensko tipizacijo antigenov HLA oz. HNA bolnika in tako potrdimo ali ovržemo možnost navzkrižne reakcije med protitelesi krvodajalca in celicami bolnika. Izvedbi laboratorijskih testov sledi izdajanje izvidov, ki jih prejme zdravnik transfuziolog, ki obravnava prijavo suma na TRALI.

Preprečevanje in zdravljenje

Palfi s sod. je leta 2001 v dvojno slepi randomizirani švedski raziskavi dokazal, da so transfuzije plazme mnogorodnic dejavnik tveganja za TRALI. Že pred tem je bilo ugotovljeno, da se incidenca protiteles anti-HLA povečuje s številom nosečnosti. Prvi so leta 2003 incidenco TRALI pričeli zmanjševati v Združenem kraljestvu z uporabo trombocitnih pripravkov (TP) in plazme moških darovalcev. V razvitem svetu se je z uporabo zdravil iz krvi, ki nadomeščajo plazmo (pripravki zlitij plazem več sto darovalcev, ki so obdelani s topili in detergenti) in TP ter plazme moških darovalcev incidenca TRALI zmanjšala za 2/3. Pri nas namenjamo zbrano plazmo darovalk od leta 2006 izključno za predelavo v zdravila iz krvi, leta 2014 pa smo pri njih prenehali opravljati še aferezne odvzeme trombocitov. Od leta 2010 je v Sloveniji vsa zbrana kri filtrirana, kar pomeni, da je po

končanem postopku v KK prisotnih $< 1 \times 10^6$ levkocitov. Na ZTM od leta 2009 izvajamo postopek patogenske redukcije z metodo z amotosalenom in UVA osvetljevanjem, ki omogoča tako inaktivacijo patogenov kot tudi levkocitov v TP, s čimer se zniža možnost prenosa s transfuzijo povezane okužbe in s transfuzijo povezane bolezni presadka proti gostitelju (*angl.* Transfusion Associated Graft Versus Host Disease, TA-GvHD). Hkrati se zmanjša verjetnost drugih NTR, tudi TRALI. Trajno odklonimo krvodajalca, čigar KK je bila transfundirana bolniku s TRALI, če pri njem potrdimo prisotnost protiteles anti-HLA oz. anti-HNA, ki so usmerjena proti antigenom prejemnika transfuzije.

Ob pojavu NTR je nujno takoj ustaviti transfuzijo, ohraniti i.v. dostop, preostanek enote in transfuzijski sistem pa shraniti. Če simptomi in znaki NTR reakcije kažejo na TRALI, je potrebno podporno zdravljenje s kisikom. Pri hudih potekih kar 70 – 80 % bolnikov potrebuje mehansko predihavanje in 25 % vzdrževanje krvnega tlaka z vazopresorji. Pri večini se stanje izboljša v 48 – 96 urah in nimajo trajnih posledic. Zdravljenje z diuretiki in kortikosteroidi je kontraindicirano.

Zaključek

TRALI je sindrom akutne dihalne stiske, ki nastopi med ali v 6 urah po transfuziji, zaradi aktivacije imunskega sistema in nastanka permeabilnega pljučnega edema. Ta huda respiracijska NTR še vedno predstavlja drugi najpogostejši vzrok za s transfuzijo povezano zbolewnost in umrljivost v razvitem svetu. V preteklih dveh desetletjih so z raziskavami osvetlili patofiziologijo TRALI in z njim povezane DT tako pri bolnikih kot tudi pri transfuzijskem zdravljenju ter tako omogočili uvedbo ukrepov za preprečevanje te potencialno smrtno NTR. Uporaba zdravil iz krvi, ki nadomeščajo plazmo, plazme in TP izključno moških darovalcev je učinkovito zmanjšala incidenco TRALI. **Analiza hemovigilančnim službam prijavljenih primerov potransfuzijskih pljučnih edemov je izziv, ki zahteva dobro sodelovanje med lečečimi zdravniki in transfuziologi.** Definicija TRALI Vlaarja in sod. iz leta 2019 je postavila dobre temelje za opredelitev primerov kot TRALI (tip I ali tip II), ARDS, TACO ali pa TRALI/TACO. Kljub preiskavam TRALI ostaja klinična diagnoza in za postavitev le-te ni potreben dokaz prisotnosti protiteles anti-HLA oz. anti-HNA. Trajno odklonimo tiste krvodajalce,

katerih KK so povzročile TRALI in pri katerih dokažemo prisotnost tovrstnih protiteles ter njihovo usmerjenost proti antigenom prejemnika transfuzije.

Literatura

1. Vlaar APJ, Toy P, Fung M, Looney MR, Juffermans NP, Bux J, et al. A consensus redefinition of TRALI. *Transfusion* 2019;59:2465-2476
2. Marić I, Mlakar P, Bricl I. Respiracijske transfuzijske reakcije. *Zdrav Vestn.* 2017;86:414-21.
3. Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM, ed. Technical Manual. 21th ed., Bethesda: AABB; 2023.p.675-708.
4. Bierling P, Bux J, Curtis B, Flesch B, Fung I, Lucas G, et al. Recommendations of the ISBT Working Party on Granulocyte Immunobiology for leucocyte antibody screening in the investigation and prevention of antibody-mediated TRALI. *Vox Sang* 2009; 96: 266-9
5. Maček Kvanka M, Potočnik M. Obravnava primerov suma na TRALI v letih 2006-2011. *Zdrav Vestn Supl* 2012; 343-352.
6. Shaz B H, Stowell S R, Hillyer C D. TRALI: from bedside to bench and back. *Blood* 2011; 117(5), 1463–1471.
7. Toy P, Lonney MR, Popovsky M, Palfi M, Berlin G, Chapman CE, et al. TRALI: 36 Years in Progress (1985-2021). *Ann Am Thorac Soc* 2022; 19(5):705-712
8. Gupta A, Yan M. Transfusion-related acute lung injury (TRALI). 25. 3. 2025 dostopano na <https://professionaleducation.blood.ca/en/transfusion/publications/transfusion-related-acute-lung-injury-trali>

Poročilo Službe za hemovigilanco za leto 2024

Aleksandra Bajt, Janja Mrak, Irena Bricl

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

aleksandra.bajt@ztm.si

Uvod

Beseda hemovigilanca izhaja iz grške besede za kri '*haema*' in latinske besede '*vigilans*', ki pomeni pozoren, čuječ. Temelji hemovigilance, kot jo poznamo danes, so bili postavljeni v Franciji in Veliki Britaniji v 90. letih prejšnjega stoletja, pri nas pa po letu 2002. Gre za skupek organiziranih ukrepov z namenom nadzora in izboljšav na področju transfuzijske medicine. Hemovigilanca obsega vse procese od odvzema krvi do transfuzije krvne komponente bolniku. Ključna področja delovanja so tri: 1) neželene reakcije pri krvodajalcih ob odvzemu krvi, 2) neželeni dogodki, povezani z ravnanjem s krvjo in 3) neželene reakcije pri bolnikih ob transfuziji krvi. Cilj je varna transfuzija krvi.

Krvodajalstvo

V letu 2024 smo transfuzijske službe v Sloveniji opravile 82.329 odvzemov pri krvodajalcih, od tega je bilo 7.221 novih krvodajalcev (8,8 %). Izdali smo 96.402 krvni komponenti (KK): 75.768 enot eritrocitov (KEF), 10.972 enot sveže zmrznjene plazme (SZP) in 9.662 enot trombocitnih pripravkov (TP). Izmed slednjih je bilo 8.355 (86,5 %) pripravkov trombocitnih zlitij in 1.307 (13,5 %) afereznih TP. Opazen je tako trend zmanjševanja števila odvzemov pri krvodajalcih kot tudi izdaje vseh KK za bolnike.

Leta 2024 smo s presejalnim testiranjem odkrili 12 krvodajalcev z okužbo, 4 so darovali kri prvič. Okužbo s sifilisom smo potrdili pri 4, pri 1 pa okužbo s HCV. V krvi 5 krvodajalcev smo dokazali

prisotnost HBV DNA, od teh so imeli 3 tudi HBsAg, druga 2 pa sodita v skupino oseb z okultno okužbo s HBV (*angl.* Occult HBV Infection, OBI). V sklopu epidemiološke študije *Prevalenca okužbe z virusom hepatitisa E (HEV) med krvodajalci v Sloveniji* smo odkrili 2 krvodajalca, ki sta imela v krvi prisotno HEV RNA. Oba sta okužbo s HEV prebolela asimptomatsko. V obdobju indikacije smo opravljali tudi testiranje na prisotnost WNV RNA, ki pa je nismo našli pri nobenem izmed krvodajalcev.

Pri 64 krvodajalcih je bil prvič pozitiven presejalni test za odkrivanje eritrocitnih protiteles v plazmi (indirektni Coombsov test, ICT) in pri 99 krvodajalcih prvič pozitiven test za odkrivanje na eritrocite vezanih protiteles (direktni Coombsov test, DCT). KK krvodajalcev s pozitivnim ICT ne uporabimo za zdravljenje bolnikov ali za izdelavo zdravil iz krvi, po ugotovljenem pozitivnem DCT pa izločimo le KEF.

Reakcije pri krvodajalcih

Ob odvzemu krvi ali KK smo zabeležili 1.244 neželenih reakcij pri krvodajalcih. Lokaliziranih reakcij je bilo 194, od teh največ hematomov (188). Generaliziranih reakcij je bilo 1.050, izmed njih pa največ vazovagalnih reakcij (748), sledijo jim citratne reakcije (302), ki so zaplet afereznih odvzemov. Število 15,11 prijavljenih reakcij pri krvodajalcih na 1.000 odvzemov je primerljivo s preteklimi leti.

Leta 2024 je Služba za hemovigilanco (SHV) Javni agenciji za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP) kot hud neželen dogodek prijavila 18 hudih reakcij pri krvodajalcih. Od teh je bilo 15 vazovagalnih reakcij z izgubami zavesti in konvulzijami ter padci s poškodbami ali pa z drugimi zapleti, zaradi katerih je bila potrebna napotitev v drugo zdravstveno ustanovo. Prejeli smo tudi prijavo hudega neželenega dogodka, ki se je zgodil po darovanju krvi že leta 2023. Krvodajalec je po odvzemu polne krvi čutil bolečino v žlički, ki se je stopnjevala do večera. Ob obisku urgentne službe se je izkazalo, da je utrpel akutni miokardni infarkt. V 2 primerih je prišlo do poškodbe živca pri afereznem postopku. Poleg navedenih hudih reakcij pri krvodajalcih je bilo v 3 primerih

naknadno ugotovljeno za darovanje neustrezno zdravstveno stanje krvodajalca in v 1 za darovanje neustrezna uporaba zdravil krvodajalca.

Neželene transfuzijske reakcije pri bolnikih

Transfuzijske službe so v letu 2024 skupno prejele 108 prijav neželenih transfuzijskih reakcij (NTR) pri bolnikih. Potrjenih je bilo 97 NTR, kar znaša 1,01 reakcije na 1.000 izdanih enot KK. Kot vsa leta doslej je prijavljanje NTR pomanjkljivo. Najpogosteje pride do NTR po transfuziji enot KEF (72,17 %), sledijo TP (15,46 %) in nazadnje SZP (12,37 %). Najpogostejša NTR je bila s 50 potrjenimi prijavami vročinska nehemolitična transfuzijska reakcija (VNHTR), na drugem mestu pa z 22 alergijska reakcija. Na tretjem mestu sledi že najpogostejša huda NTR, volumska preobremenitev s transfuzijo (*angl.* Transfusion-Associated Circulatory Overload, TACO). Hude NTR so tiste, kjer je ali pa bi lahko bilo ogroženo življenje prejemnika transfuzije, če ne bi pravočasno ukrepali. Leta 2024 je bilo JAZMP prijavljenih 20 takšnih reakcij, potrjenih pa 17. V 8 primerih je šlo za TACO. Štiri prijave s transfuzijo povezane akutne poškodbe pljuč (*angl.* Transfusion-Related Acute Lung Injury, TRALI) smo po analizi zaključili v 1 primeru kot TACO, v 3 pa ni šlo za NTR. Dve hudi NTR smo opredelili kot TACO/TRALI, obe reakciji sta bili prijavljeni kot TACO po transfuziji TP, a se je po zaključenem testiranju izkazalo, da bi lahko šlo za imunski TRALI. Po mnenju lečeče zdravnice je pri enem od bolnikov prišlo do hude alergijske reakcije z bronhospazmom po transfuziji TP, glede na klinično sliko in na podlagi potrjene navzkrižne reakcije med protitelesi anti-HLA II. razreda in celicami bolnika, pa je verjetnejša diagnoza imunski TRALI. Beležili smo 5 primerov anafilaktične reakcije, 4-krat po SZP in 1-krat po transfuziji KEF. JAZMP smo prijavili tudi 1 primer odložene hemolitične transfuzijske reakcije (OHTR) po novougotovljenih aloprotitelesih anti-E, anti-c, anti-Jk(a) in anti-Kp(a). Bolnica je prejela prve enote s stopnjo nujnosti zelo nujno (na t.i. 1. fazo po telefonu) z negativnimi navzkrižnimi preizkusi (NP) in ICT. Nato je še 2 dni prejemale antigensko neskladne enote z negativnimi NP. Teden dni zatem se je vrnila v bolnišnico z izhodiščnimi vrednostmi hemoglobina in kliničnimi ter laboratorijskimi znaki hemolize. V letu 2024 smo prejeli 2 prijavi suma na smrt zaradi transfuzije. V prvem primeru je bila smrt hematološke

bolnice kot posledica transfuzije izključena z obdukcijo, v drugem pa bo vzrok smrti onkološke bolnice zaradi odstopa lečečih zdravnikov od obdukcije ostal neznan.

Pri bolnikih in nosečnicah smo leta 2024 na novo ugotovili 652 aloprotiteles ali protiteles nerazvidne specifičnosti. Pri 81 bolnikih je bilo odkritih več protiteles hkrati in pri 87 ugotovljena prisotnost avtoprotiteles.

Neželeni dogodki

Neželeni dogodki so dogodki, povezani z ravnanjem s krvjo: od zbiranja, predelave, testiranja, hranjenja in izdaje krvi, pa tudi ravnanja s krvjo na bolnišničnih oddelkih. Delimo jih na prave dogodke in na skorajšnje napake.

Pravi dogodki so tisti, ko napako spregledamo in vpliva na transfuzijo. V 4 primerih je bila transfundirana napačna komponenta: 2-krat transfuzija KK, namenjene drugemu bolniku, 1-krat transfuzija KK napačne krvne skupine (KS) zaradi laboratorijske napake in 1-krat transfuzija KK napačne KS zaradi napake v izdaji. V 9 primerih je bila transfundirana komponenta, ki ni ustrezala zahtevam: 7-krat antigensko neustrezna, 1-krat neobsevana KK z neustreznim CMV statusom in 1-krat KK neustrezne kakovosti. Beležili smo 12 primerov napačnega ravnanja s krvjo izven transfuzijskega centra. Število pravih neželenih dogodkov je verjetno višje od števila prijav. Doslednejše prijavljanje bomo dosegli le s pripravo ustreznega obrazca za prijavo neželenih dogodkov in z izobraževanjem zdravstvenih delavcev o pomenu prijavljanja le-teh.

Pri skorajšnjih napakah napako pravočasno ugotovimo in preprečimo transfuzijo. Med neželenimi dogodki skorajšnje napake izstopajo, v letu 2024 jih je bilo 654. Največ je bilo napačno izpolnjenih naročilnic za KK ter transfuzijske preiskave (230) in napačnih orientacijskih določitev KS ABO na bolnišničnih oddelkih (258). Ugotovljenih je bilo 23 napačnih krvi v epruveti (*angl.* Wrong Blood in Tube, WBIT), kar je zelo huda napaka. Potrebno bo organizirati še večje število izobraževanj za medicinske sestre in zdravnike ter vztrajno opozarjati na problematiko.

Zaključek

V hemovigilanco smo vključeni vsi, ki na kakršenkoli način sodelujemo v transfuzijski verigi. Le z nenehnim izobraževanjem ohranjamo visoko raven znanja, ki je potrebna za pravočasno prepoznavanje neželenih dogodkov in reakcij ter ustrezno ukrepanje ob pojavu le-teh. Sistem deluje le, če neželene dogodke in reakcije vestno prijavljamo. Vsa prizadevanja so namenjena izboljšanju varnosti transfuzijskega zdravljenja.

Literatura

1. Marić I, Bricl I. Hemovigilanca – poročilo SHV 2020. Isis. 2021;11:48-50
2. Marić I. Hemovigilanca – poročilo SHV 2021. Isis. 2023;1:40-42
3. Marić I, Bajt A. Hemovigilanca – poročilo SHV 2022. Isis. 2023;12:44-46
4. Bajt A, Marić I, Bricl I. Hemovigilanca – poročilo SHV za leto 2023. Isis. 2025;2:45-48
5. Vuk T, Politis C, Laspina S, Lozano M, Haddad A. Thirty Years of Hemovigilance – Achievements and Future Perspectives. Transfus Clin Biol. 2023;30:166-172
6. 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

Preprečevanje prenosa okužb s transfuzijo krvi

Porajajoče se okužbe in njihov pomen v transfuzijski medicini

Petra Jovanovič, Maja Sočan, Klara Železnik

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

petra.jovanovic@ztm.si

Uvod

Okužbe krvodajalcev z različnimi patogeni, vključno z virusi, bakterijami in paraziti, predstavljajo grožnjo za prenos s transfuzijo. Z dokazanimi prenosi virusa Zahodnega Nila (WNV) s transfuzijo leta 2002 v ZDA, so se odprli novi izzivi pri zagotavljanju varne krvi. Arbovirusi so skupina virusov, ki jih prenašajo na človeka členonožci, kot so komarji, klopi in peščene muhe. Klimatske spremembe vplivajo na razširjenost členonožcev, ki se iz endemičnih območij širijo po svetu.

Klinično pomembni arbovirusi, njihovi vektorji in vpliv sprememb v okolju

Klinično najpomembnejše arbovire iz družine *Flaviviridae* in *Togaviridae* prenašata komarja iz rodu *Aedes aegypti* in *Aedes albopictus*. *A. aegypti* je razširjen v tropskih urbanih območjih in prenaša virus čikungunja (CHIKV), zika, denga (DENV) in virus rumene mrzlice (YFV). *A. albopictus* se je iz endemičnih območij vzhodne Azije razširil v Severno in Južno Ameriko, Afriko in Evropo, predvsem zaradi trgovine z obrabljenimi gumami in se je zaradi klimatskih sprememb tu tudi razširil. Odgovoren je za izbruhe denga in čikungunje, ki se pojavljajo lokalno, izven endemičnih območij. *Culex pipiens* je avtohtona vrsta komarja v pretežnem delu Evrope in je vektor za prenos WNV. Komarji in z njimi arbovirusi so se iz endemičnih območij razširili po svetu zaradi klimatskih sprememb kot so višje temperature, vlažnost in spremembe v količini padavin na posameznih področjih. Močno pa na prenos arbovirusov vplivamo tudi ljudje s potovanji, mednarodnim transportom in trgovino, rastjo populacije in urbanizacijo podeželja. Vdor ljudi s spremenjeno rabe zemlje, izrabo naravnih virov in širjenjem naselij v naravno okolje komarjev in njihovih naravnih gostiteljev, je povečal verjetnost človeka za stik s komarjem. Posledično prihaja do prenosa virusov iz naravnih t.i. gozdnih krogov, kjer se komarji hranijo na primatih, pticah, manjših

sesalcih ali glodalcih, na človeka. Človek je v večini primerov končni gostitelj, ker se virusi v človeku ne namnožijo v dovolj veliki koncentraciji (nizka viremija), ki bi omogočila prenos virusov s komarji na naslednjega gostitelja.

Obstajajo pa pomembne izjeme, kot so okužba z DENV, YFV in CHIKV, kjer ljudje razvijejo visoko viremijo, ki omogoča nadaljnje širjenje virusa s komarji. V urbanih območjih je v teh primerih človek primarni gostitelj vektorja. V zadnjih desetletjih se tako tudi v Evropi pojavljajo izbruhi denge in čikungunje izven endemičnih območjih, kamor virus занesejo posamezniki, ki se okuženi vračajo iz endemičnih območij. Izbruhi se pojavljajo predvsem v poletnih mesecih, zaradi optimalnih temperatur za razvoj komarjev in prenos virusov.

DENV je endemičen v tropskih in subtropskih predelih Azije, Avstralije, centralne in južne Amerike in v Afriki. Prvi lokalni izbruhi so se pojavili na Hrvaškem in v Franciji leta 2010, ter na Madeiri leta 2012. V zadnjih letih pa beležijo pogostejše avtohtone lokalne izbruhe v Španiji, Franciji in Italiji.

CHIKV je endemičen v podsaharski Afriki, Indiji, JV Aziji in na Filipinih. Genetska mutacija virusa (E1-A226V) med izbruhom na otokih v Indijskem oceanu v letih 2005-2007, pa je omogočila tudi bolj učinkovit prenos virusa s komarjem *A. albopictus*. Prvi avtohtoni izbruh izven tropske ali subtropske regije, se je pojavil v Italiji leta 2007 z 217 potrjenimi primeri okužbe, kjer je bil izvor virusa okužen potnik, ki se je vrnil iz Indije. V naslednjih letih so se pojavljali izbruhi v Franciji (leta 2010, 2014 in 2024) in Italiji (2017) z virusi prinesenimi iz Indije, Kameruna, centralne Afrike in Pakistana.

V Sloveniji so po podatkih NIJZ zabeleženi le primeri okužb z DENV pri potnikih, ki so se vračali iz endemičnih območij. V letu 2024 je bilo prijavljenih 19 in v letu 2023 devet primerov denge. V zadnjih letih ni bilo prijavljenih okužb s CHIKV.

Pomen arbovirusov v transfuzijski medicini

Ker večina okužb z DENV in CHIKV poteka brez simptomov ali z blagimi prehladu ali gripi podobnimi simptomi, virus pa se v tem času namnožuje v telesu, to predstavlja tveganje za prenos okužbe v primeru darovanja krvi. Dokazovanje prenosa arbovirusne okužbe s krvnimi

komponentami pa je zahtevna naloga. Za nedvoumno potrditev prenosa s transfuzijo je potrebno dokazati prisotnost virusa v vzorcu dajalca ali v krvni komponenti. Istočasno je potrebno potrditi, da prejemnik pred transfuzijo ni bil okužen oziroma, da ni prišlo do pika okuženega vektorja tekom zdravljenja. To je posebej zahtevno v endemičnih območjih, kjer so ljudje izpostavljeni pikom komarjev ves čas, razen ko so sprejeti v intenzivne enote. Filogenetska analiza virusa dajalca in prejemnika, prav tako ni dokaz za prenos s transfuzijo, če dajalec in prejemnik živita na istem območju. Veliko arbovirusnih okužb s transfuzijo verjetno niti ni zaznanih, ker prejemnik ne kaže simptomov ali pa pride do prenosa v času izbruha okužb na določenem geografskem območju in okužba prejemnika preko komarja ni izključena.

V literaturi je bilo do leta 2022 opisanih 74 primerov prenosa arbovirusov s transfuzijo, v katerih je bilo udeleženih 10 različnih arbovirusov. V 42 (56,8%) primerih je šlo za prenos WNV, v 18 (24,3%) primerih se je prenesel DENV in v po 3 primerih sta se prenesla ZIKV in YFV. Prenos je bil večinoma posledica transfuzije eritrocitov (47,3%). Med prejemniki jih je 54,1% imelo oslabljen imunski odgovor. 63,5% okuženih je zbolelo, kar 18,9% vseh primerov prenosa pa je bilo smrtnih. 90% prenosov WNV s transfuzijo je bilo zabeleženih v ZDA, kjer je 73% okuženih razvilo simptome okužbe, od katerih jih je 31% umrlo. 50% prenosov DENV je bilo opisanih v Braziliji, kjer so se simptomi pojavili v 61%, smrtnih primerov pa ni bilo.

Ker je prenos arbovirusov s transfuzijo verjetno podcenjen in so izbruhi okužb izven endemičnih območij vse pogostejši, je potrebno sprejeti določene ukrepe za izboljšanje varnosti krvnih komponent. Osnovno merilo je odklanjanje dajalcev s simptomi, vendar s tem ne preprečimo prenosa okužbe, kadar gre lahko za asimptomatsko okužbo. V mnogih državah, tudi v Sloveniji, zato odklanjamo potnike, ki se vračajo iz endemičnih predelov oziroma iz območij, kjer je prišlo do izbruha. Pogosto v regijah, kjer pride do izbruha okužb, ustavijo zbiranje krvi, kar lahko neugodno vpliva na preskrbo s krvjo, ali pa uvedejo testiranje. Presejalno testiranje krvodajalcev z določanjem nukleinskih kislin (NAT) se je izkazalo za učinkovit ukrep za zmanjšanje prenosa arbovirusov s krvjo. Dodatno k varnosti transfuzije prispeva inaktivacija patogenov v krvnih komponentah.

Zaključek

S klimatskimi spremembami, povečanim številom potovanj v endemična območja, mednarodnim transportom in trgovino ter vdorom ljudi v naravno okolje vektorjev so se vektorji in arbovirusi razširili izven endemičnih območij in povzročajo vedno bolj pogoste izbruhe okužb. Nenadni izbruhi vplivajo na preskrbo s krvjo, asimptomatski potek okužb pa na varnost krvnih komponent. Za omejitev oziroma omilitev teh posledic, je potrebno pripraviti plan ukrepov. V Sloveniji imamo načrt pripravljenosti za ZIKV in WNV.

Literatura

1. Petersen L. R., Busch M.P. Transfusion-transmitted arboviruses. *Vox Sanguinis* 2010; 98: 495-503.
2. Katz LM, Dodd RY, Saa P, Gorlin JB, Palmer K, Hollinger FB, et al. Infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety (an update to the 2009 Transfusion supplement). *Transfusion*. 2024;64(S1): S1–S3.
3. Gimenez-Richarte A, Ortiz de Salazar MI, Gimenez-Richarte M-P, Collado M, Fernandez PL, Clavijo C, et al. (2022) Transfusion-transmitted arboviruses: Update and systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 16(10): e0010843.
4. Sočan M, Praprotnik M. Spremljanje nalezljivih bolezni, ki jih prenašajo členonožci v Sloveniji v letu 2023. *Spremljanje nalezljivih bolezni, ki jih prenašajo členonožci v Sloveniji*. 2024:1-26. Dostopno na: <https://nijz.si/nalezljive-bolezni/spremljanje-nalezljivih-bolezni/spremljanje-nalezljivih-bolezni-ki-jih-prenasajo-clenonozci-v-sloveniji/>
5. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/mosquito-borne-diseases-emerging-threat>

Virus Zahodnega Nila in preskrba s krvjo

Polonca Mali, Valentina Filipović Samec, Klara Železnik, Polona Nograšek

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

polonca.mali@ztm.si

Uvod

Virus Zahodnega Nila (angl. West Nile Virus, WNV) se lahko prenaša s transfuzijo okužene krvi, kot tudi s transplantacijo tkiv in organov. Za zagotavljanje varnih krvnih pripravkov, zato transfuzijske službe, ko ne izvajajo presejalnega testiranja odvzete enote krvi na prisotnost WNV, uvedejo ukrep odloga darovanja krvi (odklon) za vse krvodajalce za obdobje 28 dni po vrnitvi iz področja prisotnosti kroženja WNV (okuženi komarji, konji, ptice, pojavljanje okužb pri ljudeh).

V Sloveniji naravne danosti omogočajo obstoj prenašalca ter skupno s preteklimi in sezonskimi podatki iz sosednjih držav (poročila iz Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni; angl. European Centre for Disease Prevention and Control; ECDC), nakazujejo na možnost pojava WNV tudi pri nas.

V post-kovidnem času so v porastu tudi potovanja ljudi v epidemiološko »vroče« predele, kot tudi kratkotrajni redni obiski (delovne migracije) z WNV prizadetih regij v balkanskih državah, kar dodatno poveča tveganje za prenos WNV okužbe. Večina okuženih ljudi namreč ne kaže znakov bolezni ali pa imajo znake podobne gripi, kot so vročina, glavobol, bolečine v mišicah in utrujenost. V nekaterih primerih ima lahko bolezen hud potek, vključno s prizadetostjo osrednjega živčnega sistema. Večina primerov klinično zaznane okužbe se pojavlja od sredine julija do konca septembra. Pojavljanje bolezni je odvisno od številnih dejavnikov, kot so prisotnost in aktivnost prenašalcev (komarjev) ter naravnega rezervoarja virusa (ptice). Preskrba s krvjo, je zato lahko v poletnih mesecih ogrožena, saj je darovanje krvi za krvodajalca odloženo za 28 dni, kar vpliva na dnevno število odvzetih enot krvi na krvodajalskih akcijah. Potrebe po krvi v zdravstvu pa so kljub

počitniškemu času povečane zaradi večjega števila bolnikov s poškodbami, transplantacijskih programov in potreb zdravljenja hemato-onkoloških bolnikov.

Metode

Od pojava COVID-19 v letu 2020 dalje, izvajamo telefonsko triažo ustreznosti krvodajalca za darovanje krvi s preverjanjem epidemiološkega in zdravstvenega stanja krvodajalca, ob telefonskem naročilu za določitev termina odvzema krvi. Oceniti in analizirati smo želeli število odklonjenih krvodajalcev pred prihodom, kot tudi na sami krvodajalski akciji (KA), ter s tem ugotoviti vpliv na preskrbo s krvjo in potrebo po dodatnem vabljenju nadomestnih krvodajalcev. Za lažje statistično spremljanje smo zato v letu 2023 vpeljali nova računalniška vzroka (kodi) odklona ter tako pridobili podatke o številu odklonjenih krvodajalcev zaradi tveganja za okužbo, ki se lahko prenaša s krvjo na potovanjih (malarija, denga, chikungunya...) in tveganja za okužbo na področju WNV. Težavno zagotavljanje zadostnega števila odvzemov krvi, torej tudi nemotene preskrbe s krvjo brez kritično znižanih zalog posameznih krvnih komponent določenih krvnih skupin (npr. RhD-negativnih krvnih skupin) bi tako podprla potrebo po uvedbi rednega presejalnega testiranja enot odvzete krvi na prisotnost okužbe (testiranje NAT na WNV RNA).

Rezultati

V tabeli prikazujemo podatke pridobljene na podlagi statistike odklonov krvodajalcev iz transfuzijskega računalniškega sistema DATEC, sedmih Centrov Zavoda RS za transfuzijsko medicino (ZTM) v letih 2018-2024. Ocenjujemo, da ima povprečni 10% odklon krvodajalcev zaradi potovanj, pomemben vpliv na celokupno število enot zbrane krvi, saj se letno udeleži KA cca 65.000 krvodajalcev. V poletni sezoni v letih 2023 in 2024 smo dodatno, že ob telefonskem naročanju, odklonili cca 5.000 krvodajalcev, kar je okvirno enomesečna količina potrebnih enot krvi.

Tabela. Število (%) odklonjenih krvodajalcev po vzroku odklona: skupno (potovanje: splošno, ostalo) / obisk za WNV tveganega področja

	jan	febr	mar	april	maj	jun	jul	avg	sep	okt	nov	dec	skupaj	%	WNV(%)
2018	48	41	58	63	78	73	99	125	73	69	70	52	849	9,6	np
2019	59	48	70	44	149	81	112	58	55	92	83	128	979	10,4	np
2020	134	160	129	65	44	57	54	38	42	42	29	32	826	13,8	np
2021	15	18	46	42	68	42	53	43	44	48	49	63	531	9	np
2022	26	40	48	46	108	136	94	94	84	84	94	19	873	13	np
2023	12	8	12	13	29	35	16	23	12	22	22	6	210	2,9	5,8
2024	2	5	5	8	28	35	17	10	3				93	3,3	10,3

Zaključek

Na podlagi analize podatkov in vpliva števila odklonov krvodajalcev zaradi potovanj ter obiska za okužbo z WNV tveganih področjih na celotno preskrbo s krvjo, še posebno v poletnih (kritičnih) mesecih, smo uspešno posodobili Pravilnik o obveznem testiranju krvi in komponent krvi. S tem bo od leta 2025 dalje, omogočeno obvezno presejalno testiranje na prisotnost WNV RNA v sezoni pojavljanja WNV od junija do novembra. To bo poleg nemotene preskrbe s krvjo, omogočilo tudi zgodnje odkrivanje asimptomatskih okužb med ljudmi, prispevalo k epidemiološkem nadzoru WNV okužb, kot tudi zagotovilo večjo varnost transfuzijskega zdravljenja.

Literatura

1. Surveillance report ECDC: Weekly communicable disease threats report, Week 47, 16–22 November 2024.
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Communicable-disease-threats-report-week-47-2024.pdf>
2. Maja Sočan, Danica Avsec, Tatjana Avšič – Županc, et.al. Načrt pripravljenosti na pojav virusa Zahodnega Nila, predlog delovne skupine za leto 2019, NIJZ.
<https://nijz.si/nalezljive-bolezni/nalezljive-bolezni-od-a-do-z/virus-zahodnega-nila-west-nile-virus-wnv/>

3. Pravilnik o obveznem testiranju krvi in komponent krvi. Uradni list RS, št. 9/07, 62/18 in 92/24

Hepatitis E – stanje v EU

Polonca Nograšek, Klara Železnik

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

polona.nograsek@ztm.si

Hepatitis E je akutna ali kronična okužba z virusom hepatitisa E (HEV), ki je najpogostejši povzročitelj akutnega virusnega hepatitisa po vsem svetu. Poznamo 8 genotipov HEV, pri človeku povzročajo bolezen genotipi 1 – 4 (HEV-1, HEV-2, HEV-3 in HEV-4). HEV-1 in HEV-2 sta skupaj ali posamično endemična predvsem v Afriki, Rusiji, Indiji in Kitajski in okužita samo ljudi. Širita se po fekalno-oralni poti in povzročata epidemije v državah v razvoju. HEV-3 in HEV-4, ki sta skupaj ali posamično endemična predvsem v Evropi, ZDA, Južni Ameriki, Indoneziji in Avstraliji, pa okužita živali in ljudi in povzročata zoonozo. Na ljudi se HEV-3 in HEV-4 prenašata preko okužene, nepravilno kuhane svinjine ali divjačinskega mesa ali drugih mesnih izdelkov, pa tudi s školjkami ali kontaminirano zelenjavo. Prenos pa je možen tudi z nosečnice na plod ter s transfuzijo krvnih pripravkov (TT-HEV). Krvodajalci so izpostavljeni kontaminirani hrani, s katero se okužijo s HEV, posledično pa so bolniki izpostavljeni kontaminiranim krvnim pripravkom. V literaturi je zabeleženih 45 prenosov HEV s transfuzijo krvnih pripravkov (tudi s SD-Plazmo), ki so bili potrjeni z molekularno metodo dokazovanja istovetnosti identitete virusa v dajalcu in prejemniku s primerjavo določenih zaporedij v genomu virusa.

V Evropi je večina okužb avtohtonih in asimptomatskih. Akutne okužbe navadno izzvenijo same od sebe. Pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom, kot so prejemniki solidnih organov ali krvotvornih matičnih celic, pa lahko preidejo v kronično okužbo s tveganjem za razvoj ciroze jeter, ki lahko vodi v odpoved jeter. Hepatitis E se lahko kaže tudi v zunajjetrnih manifestacijah in je bil

opisan v povezavi s kliničnimi sindromi v drugih organskih sistemih (nevrološki, ledvični, hematološki in drugo).

Prvi primer TT-HEV je bil opisan v literaturi leta 2004 (odkrit 2002 na Hokkaidu, Japonska) pri 67-letnem bolniku, ki nikoli ni bil v tujini. Prejel je več transfuzij krvnih pripravkov 23 prostovoljnih dajalcev in nato zbolel za akutnim hepatitisom. Po izvedenem testiranju na označevalce virusov hepatitisa so bili kot povzročitelji izločeni vsi običajni povzročitelji. Kasneje so v njegovi krvi odkrili prisotnost HEV RNA ter protitelesa IgM in IgG anti-HEV. Po retrogradnem dokazovanju so v eni od transfundiranih enot sveže zamrznjene plazme dokazali HEV RNA. Z dodatnim molekularnim testiranjem so dokazali istovetnost virusa v krvi dajalca in prejemnika v dveh različnih regijah genoma HEV znotraj odprtega bralnega okvirja 1 (ORF 1).

Kmalu po prvi objavi opisanega TT-HEV so bile v Evropi izvedene prve študije prisotnosti protiteles IgG anti-HEV. Prvi so študijo izvedli v južni Franciji v regiji Midi-Pyrénées, kjer so med krvodajalci ugotovili kar 52,5% prevalenco IgG anti-HEV. V isti študiji so z metodo PCR dokazovali tudi prisotnost HEV RNA v 18 različnih mesnih izdelkih (klobase). HEV RNA so dokazali v 8 od 18 (44%). Kasneje (2007) so izvedli študiji tudi v severni Franciji. Prevalenca IgG anti-HEV je bila 2,9% in 3,5%, kar kaže, da se lahko prisotnost virusa močno razlikuje že med manjšimi geografskimi regijami na istem področju. Med prvimi so IgG anti-HEV med krvodajalci iskali še na Škotskem (2004-2008) in ugotovili 4,7% prevalenco, leta 2011 pa v Nemčiji (6,3%) in na Nizozemskem (26,7%). Kasneje je vse več držav začelo izvajati podobne prevalenčne študije. Prevalenca IgG anti-HEV med krvodajalci se močno razlikuje med državami ali celo med regijami iste države. Najnižje so ugotovili v študiji, ki je zajemala centralno Italijo leta 2013 (3,5%), na Škotskem v ponovni študiji leta 2013 (5,7%) in na Irskem leta 2016 (5,3%). V nekaterih državah pa je bila ugotovljena zelo visoka prevalenca: Španija 20%, Hrvaška 20,2%, Švica 20,7%, Bolgarija 25,9%, Nizozemska 26,7%, Nemčija 29,5%, Poljska 43,5%. Prisotnost protiteles IgG anti-HEV med krvodajalci smo ugotavljali tudi v Sloveniji in sicer v dveh študijah, leta 2019 in 2024. Obakrat smo ugotovili skoraj enako

prevalenco, in sicer 7,4% in 7,3%, kar kaže stabilno vrednost prekuženosti med krvodajalci v Sloveniji. Glede na prisotnost protiteles IgG anti-HEV se države uvrščajo v tri skupine: države z nizko prevalenco (<10%), s srednjo prevalenco (10-20%) in z visoko prevalenco (>20%). Slovenija se tako uvršča med države z nizko prevalenco.

Z nekajletnim zamikom (natančneje leta 2011) pa so transfuzijske ustanove začele izvajati študije prisotnosti HEV RNA med krvodajalci. Na ta način se ugotavlja prisotnost akutne okužbe med zdravimi krvodajalci z asimptomatsko okužbo s HEV, ki se navadno izrazi z enoto "en primer na X odvzemov" (1:X). Zopet so avtorji poročali o širokem razponu vrednosti: od 1:814 (Nemčija) pa do 1:14.520 (Škotska). V večini študij so izvedli tudi genotipizacijo in dokazali genotip 3. Tudi v obeh slovenskih študijah smo izvedli dokazovanje HEV RNA med krvodajalci. Testiranje smo izvedli na obstoječih sistemih za NAT presejalno testiranje. Pretestirali smo 9.284 (leta 2019) in 8.928 (leta 2024) krvodajalcev. V prvi študiji smo odkrili 5 asimptomatskih HEV RNA pozitivnih krvodajalcev (1:1.858), v drugi pa 2 (1:4.464). Genotipizacijo smo izvedli le v prvi študiji. V enem primeru genotip ni bil določljiv, v ostalih 4 pa je bil prisoten genotip 3. Glede na podatke v literaturi je povprečna prevalenca HEV RNA v EU 1:3109 enot, kar nas uvršča pod povprečje.

V EU 9 držav izvaja testiranje na HEV RNA pri krvodajalcih (Irska, Združeno kraljestvo, Francija, Nizozemska, Nemčija, Španija, Luksemburg, Švica, Avstrija), od tega le Irska testira posamezne donacije, ostale pa izvajajo testiranje zlitij (pool). Nekatere države pa menijo, da testiranje ni potrebno ali stroškovno učinkovito, zato se po izvedenih študijah za testiranje niso odločili (ZDA, Kanada, Švedska, Danska, Italija). Tudi med državami, ki so že uvedle testiranje, se to medsebojno razlikuje: selektivno za posamezne bolnike ali univerzalno testiranje vseh odvzetih enot, posamezne donacije (ID) ali zlitja več vzorcev. Večina držav zaradi mnogo lažje logistike izvaja univerzalno testiranje vseh enot. Krvodajalca, pri katerem je ugotovljena prisotnost HEV RNA, večinoma odklonijo od darovanja za 6 mesecev, odvzete enote pa ne uporabijo za transfuzijo.

Razprave o najboljši strategiji za zmanjšanje TT-HEV še vedno potekajo. Prenos HEV s transfuzijo krvi in krvnih pripravkov zaradi relativno visoke razširjenosti protiteles in viremije med asimptomatskimi krvodajalci ostaja resna skrb. Tveganje za okužbo in resen potek le-te je sicer

večje pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom. Vendar pa razmišljanje o testiranju vseh odvzetih enot na HEV RNA sproža pomisleke. Kljub opravljenim študijam se tako v večini držav še niso odločili za univerzalno presejalno testiranje na HEV RNA, tudi zaradi pomanjkanja večjega števila študij kliničnega pomena in stroškovne učinkovitosti presejanja krvodajalcev. Za zmanjšanje tveganja za TT-HEV so bile predlagane tudi različne metode za inaktivacijo patogenov. V visokoendemičnih regijah pa je presejalno testiranje NAT zagotovo edina strategija za povečanje varnosti transfuzije.

Literatura

1. Singson, S., Shastri, S., Sudheesh, N., Chawla, K., Madiyal, M., Kandasamy, D., & Mukhopadhyay, C. (2024). Assessment of Hepatitis E virus transmission risks: a comprehensive review of cases among blood transfusion recipients and blood donors. *Infection Ecology & Epidemiology*, 14(1).
2. Boland F, Martinez A, Pomeroy L, O'Flaherty N. Blood Donor Screening for Hepatitis E Virus in the European Union. *Transfus Med Hemother*. 2019 Apr;46(2):95-103.
3. Tanaka A, Matsubayashi K, Odajima T, Sakata H, Iida J, Kai K, et al. Universal nucleic acid donor screening revealed epidemiological features of hepatitis E and prevented transfusion-transmitted infection in Japan. *Transfusion*. 2024; 64(2): 335–347.
4. Treagus, S., Wright, C., Baker-Austin, C. et al. The Foodborne Transmission of Hepatitis E Virus to Humans. *Food Environ Virol* 13, 127–145 (2021).
5. Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, Takahashi K, Mishiro S, Imai M, Takeda N, Ikeda H. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion*. 2004 Jun;44(6):934-40.
6. Bi H, Yang R, Wu C, Xia J. Hepatitis E virus and blood transfusion safety. *Epidemiol Infect*. 2020 Jun 29;148–158.

