

Sadržaj

Plenarna predavanja

- PL1-1: Istraživanja iz laboratorijske medicine na velikim nadmorskim visinama 9
Huber A, Pichler J, Hefti U, Weinberger K
- PL2-1: Utjecaj tehnoloških inovacija u laboratorijskoj medicini na učinkovitost zdravstvene zaštite 10
Stavljenić-Rukavina A
- PL3-1: Medicina temeljena na dokazima – Koji ustroj istraživanja daje najbolji odgovor na moje pitanje? 11
Horvath AR

Simpozijaska predavanja

- S0 – Predkongresni simpozij: U korak s promjenama – laboratorijska dijagnostika danas i sutra 13
- S01 – Laboratorijska imunologija 18
- S02 – Farmakogenetika 25
- S03 – Akreditacija u medicinsko-biokemijskim laboratorijima 32
- S04 – Laboratorijska hematologija 38
- S05 – Molekularna dijagnostika 44
- S06 – Prijeanalitička i poslijeanalitička faza laboratorijske dijagnostike 49
- S07 – Transplantacija 55
- S08 – Laboratorijska koagulacija 62
- S09 – Ateroskleroza 69
- S10 – Laboratorijska medicina temeljena na dokazima 77

Znanstvene radionice

- ZR1 – Toksikologija 85
- ZR2 – Kontrola kvalitete: Vanjska procjena kvalitete rada medicinsko-biokemijskih laboratorija u Hrvatskoj 89
- ZR3 – Edukacija 97

Contents

Plenary lectures

- PL1-1: Laboratory medicine research on highest niveau 9
Huber A, Pichler J, Hefti U, Weinberger K
- PL2-1: The impact of laboratory technological innovations on efficacy in health care 10
Stavljenić-Rukavina A
- PL3-1: Evidence Based Laboratory Medicine – What study design answers my question best? 11
Horvath AR

Symposium lectures

- S0 – Precongress symposium: Keeping pace with on going changes – laboratory diagnosis today and tomorrow 13
- S01 – Laboratory immunology 18
- S02 – Pharmacogenetics 25
- S03 – Accreditation in medical biochemistry laboratories 32
- S04 – Laboratory hematology 38
- S05 – Molecular diagnostics 44
- S06 – Pre-analytical and post-analytical phases of the laboratory diagnostics 49
- S07 – Transplantation 55
- S08 – Laboratory coagulation 62
- S09 – Atherosclerosis 69
- S10 – Evidence based laboratory medicine 77

Scientific workshops

- ZR1 – Toxicology 85
- ZR2 – Quality control: External Quality Assessment program for medical biochemistry laboratories in Croatia 89
- ZR3 – Education 97

Posteri

P01 – Akreditacija, organizacija i upravljanjelaboratorijem	105
P02 – Kardio- i cerebrovaskularne bolesti	108
P03 – Hematologija i koagulacija	114
P04 – Bubrežne bolesti	123
P05 – Bolesti jetre i gastrointestinalnog trakta	124
P06 – Endokrinologija	130
P07 – Koštani metabolizam	135
P08 – Molekularna dijagnostika	137
P09 – Imunologija	144
P10 – Onkologija i tumorski biljezi	151
P11 – Toksikologija i TDM	153
P12 – Procjena analitičkih sustava	154
P13 – Plućne bolesti	168
P14 – Ostalo	173
Popis izlagača	181
Indeks autora	183
Upute za autore	185

Posters

P01 – Accreditation, organization and laboratory management	105
P02 – Cardio- and cerebrovascular diseases	108
P03 – Haematology and coagulation	114
P04 – Nephrological diseases	123
P05 – Liver and gastrointestinal diseases	124
P06 – Endocrinology	130
P07 – Bone metabolism	135
P08 – Molecular diagnosis	136
P09 – Immunology	144
P10 – Oncology and tumor markers	151
P11 – Toxicology and TDM	153
P12 – Evaluation of analytical systems	154
P13 – Lung diseases	168
P14 – Other	173
List of exhibitors	181
Author index	183
Instructions to authors	185

6. hrvatski kongres medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem, Supetar, Brač, 30. rujna – 4. listopada 2009.

6th Croatian Congress of Medical Biochemists with international participation, Supetar, Brač, Croatia, September 30 – October 4, 2009

Organizator / Organizer

Hrvatsko društvo medicinskih biokemičara – HDMB
Croatian Society of Medical Biochemists – HDMB

Predsjednica kongresa / Congress President

Elizabeta Topić

Organizacijski odbor / Organizing Committee

Ana-Maria Šimundić – predsjednica / president

Ivana Čelap

Andrea Čipak

Ana Galović

Biserka Getaldić

Manuela Lovrić

Mirjana-Mariana Kardum-Paro

Marijana Miler

Nora Nikolac

Alenka Pezo

Mario Štefanović

Daniela Šupe Domić

Nada Vrkić

Znanstveni odbor / Scientific Committee

Dunja Rogić – predsjednica / president

Lidija Bilić-Zulle

Dubravka Čvorišćec

Štefica Dvornik

Zlata Flegar-Meštrić

Lorena Honović

Mladen Petrovečki

Ilza Salamunić

Jadranka Sertić

Vatroslav Šerić

Ana-Maria Šimundić

Elizabeta Topić

Tihana Žanić-Grubišić

Tajništvo Kongresa / Congress Secretariat

Sanda Berženji – tajnica / secretary

Hrvatsko društvo medicinskih biokemičara / Croatian Society of Medical Biochemists

Boškovićeve 18

10 000 Zagreb, Croatia

Tel./Fax: 01 48 28 133 / Phone/Fax: +385 1 48 28 133

E-mail: kongres@hdmb.hr

Službena web stranica Kongresa / Congress official web site

<http://www.hdmb.hr/>

**6. hrvatski kongres
medicinskih biokemičara
s međunarodnim sudjelovanjem,
Supetar, Brač, 30. rujna – 4. listopada 2009.**



**6th Croatian Congress
of Medical Biochemists
with international participation,
Supetar, Brač, Croatia, September 30 – October 4, 2009**

Supokrovitelji / Auspices

International Federation of Clinical Chemistry and laboratory Medicine – IFCC



European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine – EFCC



Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta (Ministry of Science, Education and Sports) i



Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi (Ministry of Health and Social care)



Organizacijski odbor Kongresa najsrdačnije zahvaljuje svima koji su pružili nesebičnu financijsku potporu organizaciji ovog skupa / Organizing Committee cordially extends its appreciation to the following companies and organizations who have made generous contributions to the organization of this meeting.

Zlatni sponzor / Golden sponsor



SIEMENS

Srebrni sponzor / Silver sponsor



u suradnji s / in association with



Brončani sponzor / Bronze sponsor



Hvala svim donatorima koji su svojim priložima pomogli organizaciju Kongresa / Many thanks to all donors for their generous contribution to the organization of the Congress

Donatori / Donors

 arnerić	 Autokuća Kovačić d.o.o.		 BRAC FINI SAPUNI
 Hotel CROATIA ★ ★ ★	 Jadrankamen d.d. Industrija za proizvodnju kamena i proizvode - Pula	Jago komerc d.o.o.	
 Lustra d.o.o.	 KOMED www.komed.hr	 "Marconi inženjering" d.o.o. za projektiranje, izvođenje i izd.	Mesnica Ban
 OPĆINA DIKMO	 Općina Dubopolje Općina Dubopolje, Dubopolje 10000	Općina Hrvace	
 Kordić komerc d.o.o.	POTOK STINA kamenoklesarski obrt	PZ Postira	 POLJOPRIVREDNA ZADRUGA SVIRČE
 Rada trgovina d.o.o.	Rivalitas d.o.o.		Splitsko dalmatinska županija 
 TEKO d.o.o. građiteljstvo i trgovina	Ture d.o.o.		Turistička zajednica grada Supetra SUPETAR
Zračna luka Split			

Srijeda / Wednesday

10:00–19:00	Registracija / Registration
15:00–17:00	Svečani predkongresni simpozij u čast prof. dr. Elizabete Topić / Ceremonial pregress symposium in honour of Prof. Elizabeta Topić
17:30–19:00	Otvaranje kongresa / Opening ceremony
18:15–19:00	Počasno predavanje / Honorary lecture
19:00	Koktel dobrodošlice / Welcome cocktail

	1. 10. 2009.		2. 10. 2009.		3. 10. 2009.		
	Četvrtak / Thursday		Petak / Friday		Subota / Saturday		
8:30-11:00	S1	S2	S4	S5	S7	S8	S9
11:00-11:30	Pauza za kavu / Coffee break						
11:30-12:15	PL1		PL2		PL3		
12:30-13:30	ZR1	PK	ZR2		ZR3		
13:30	Ručak / Lunch						
13:45-15:15	IR1		IR2	IR3	IR4		
15:30-18:00	S3		S6		S10		
20:00	Koncert / Concert				Svečana večera / Gala dinner		

Subota / Saturday

17:50–18:10	Zatvaranje kongresa / Closing ceremony
-------------	--

Nedjelja / Sunday

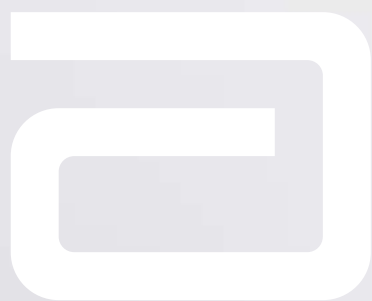
9:00–15:00	Izlet / Excursion
------------	-------------------

Legenda / Legend

S	simpozij / symposium
PL	plenarno predavanje / plenary lecture
ZR	znanstvena radionica / scientific workshop
PK	promocija knjige / book promotion
IR	industrijska radionica / industry sponsored workshop

Dvorana / Hall

	Palma
	Kaktus
	Maslina



Science can transform a lab.
Great science can transform a laboratorian.

ARCHITECT ci4100*
ARCHITECT ci8200
ARCHITECT c4000
ARCHITECT c8000
ARCHITECT i1000SR
ARCHITECT i2000SR

* In development

ARCHITECT familija analizatora naglašava utjecaj napredne tehnologije i predstavlja prvu pravu integraciju biokemijskog i imunokemijskog analizatora. Jedinствене tehnologije kao što su Robotic Sample Handler, FlexRate i CHEMIFLEX promijeniti će vašu dnevnu rutinu.

Put science on your side.

 **Abbott**
A Promise for Life

PL1-1

Istraživanja iz laboratorijske medicine na velikim nadmorskim visinama

Huber A¹, Pichler J¹, Hefti U², Weinberger K³

¹Kantonálna bolnica Aarau, Aarau, Švicarska

²Kantonálna bolnica Liestal, Liestal, Švicarska

³Biokrates Innsbruck, Innsbruck, Austrija

Tijekom dva ekspedicijska istraživanja na velikim nadmorskim visinama 2005. (Muztagh Ata, 7.627 m, zapadna Kina s 34 dobrovoljaca) i 2009. (Pik Lenin, 7.230 m, Kirgistan s 30 dobrovoljaca) provedeno je sakupljanje krvi i pokušno testiranje na raznim visinama iznad 6.800 m, kako bi se dobio uvid u patomehanizam akutne visinske bolesti (engl. *acute mountain sickness*, AMS), visinskog plućnog edema (engl. *high altitude pulmonary edema*, HAPE), i moždanog edema (engl. *high altitude cerebral edema*, HACE). Procjena funkcije bubrega, srca i koagulacije metodom procjene brzine glomerularne filtracije pomoću kreatinina (eGFR kreat) i cistatina C (eGFR cist), ANP, BNP i CNP, otkrila je 30%-tno smanjenje GFR, izostanak značajnih promjena srčanih biljega, no otkrivene su značajne promjene u sklonosti zgrušnjavanja i krvarenja. Nije nađena povezanost s akutnom visinskom bolesti, no otkrivene su neke povezanosti s HACE i HAPE kod bubrežnih promjena, ovisno o nadmorskoj visini. Nadalje, metodom masene spektrometrije (metabolomika) ustanovljene su značajne metaboličke promjene, što ukazuje na stvaranje reaktivnih spojeva kisika (engl. *reactive oxydative species*, ROS) uvjetovano nadmorskom visinom. Tijekom druge ekspedicije korišten je protokol dvostruko slijepog istraživanja te postavljena teorija o smanjenom stvaranju ROS i poboljšavanju tolerancije vježbanja kao i pogoršanje stanja AMS, HACE i HAPE. Na kraju treba spomenuti da su ove dvije ekspedicije omogućile jedinstvenu istraživačku aktivnost u uzbudljivoj okolini i s izvanrednim timom.

e-pošta: andreas.huber@ksa.ch

PL1-1

Laboratory medicine research on highest niveau

Huber A¹, Pichler J¹, Hefti U², Weinberger K³

¹Kantonsspital Aarau, Aarau, Switzerland

²Kantonsspital Liestal, Liestal, Switzerland

³Biokrates Innsbruck, Innsbruck, Austria

During 2 high altitude research expeditions in 2005 (Muztagh Ata, 7'627 m, Western China with 34 volunteers) and in 2009 (Pik Lenin, 7'230 m, Kirgistan with 30 volunteers) blood sampling and exercise testing was performed at different altitudes up to 6,800 m in order to gain insight into pathomechanisms of acute mountain sickness (AMS), high altitude pulmonary edema (HAPE), and high altitude cerebral edema (HACE). Evaluation of renal function, cardiac function und coagulation by eGFR kreat and eGFR cist, ANP, BNP and CNP as well es various coagulation tests revealed a 30% reduction of GFR, no significant changes of cardiac markers, yet significant prothrombotic as well as hemorhagic changes of coagulation. No correlation with AMS was found, but some correlations with HACE and HAPE were seen in renal changes dependent on altitudes. Further, significant metabolic changes were detectable using mass spectrometric methods (metabolomics) indicating altitude dependent generation of reactive oxydative species (ROS). During the second expedition using a double blind study protocol, we postulated attenuation of ROS generation and improvment of exercise tolerance as well as amelioration of AMS, HACE and HAPE. Finally, the 2 expeditions allowed for an unique research activity in an exciting environment and team constellation.

e-mail: andreas.huber@ksa.ch

PL2-1

Utjecaj tehnoloških inovacija u laboratorijskoj medicini na učinkovitost zdravstvene zaštite

Stavljenić-Rukavina A

Hrvatska komora medicinskih biokemičara, Zagreb

Brojne nove tehnologije u zdravstvenom sustavu i u društvu zahtijevaju kritičku procjenu djelotvornosti i sigurnosti. To je osobito važno u pogledu promjena u zdravstvenom sustavu i zbog sveukupne potrebe za više djelotvornosti i primjene novih dijagnostičkih testova ili inovativnih lijekova zasnovane na dokazima. Ovaj pregled se osvrće na pretrage uz bolesnika (engl. *point of care*, POC) te na učinkovitu uporabu novih djelotvornih lijekova u onkologiji, koja se temelji na laboratorijskim pretragama. Promjene u organizaciji zdravstvenog sustava, težnja za smanjivanjem bolničkih troškova u korist dnevne bolničke njege, kućne njege kroničnih bolesnika, kontinuitet skrbi između bolničke i kućne njege, zahtijeva dobru komunikaciju između liječnika, bolesnika i obitelji. Unapređenje POC, ne-invazivne pretrage nekih važnih analita u ljudskom tijelu, ima bitnu ulogu u kućnoj skrbi, ali zahtijeva edukaciju bolesnika u primjeni i kontroli kvalitete dijagnostičkih pretraga.

Današnji pristup liječenju tumora, tj. molekularno-ciljane terapije predstavljaju značajan napredak u liječenju u odnosu na proteklih 10 godina. Međutim, terapije nisu učinkovite za svakog bolesnika, odnosno nisu djelotvorne u istoj mjeri, te bi pretraga za utvrđivanje djelotvornosti lijeka mogla biti ključni iskorak u personaliziranju liječenja. Uz to, većina bolesnika danas ne prima samo ciljane lijekove, nego ih dobivaju u kombinaciji s kemoterapijskim lijekovima. Prema tome, postojeća DNA i RNA testiranja ne odražavaju način na koji se danas obrađuje tumor u medicini. Iz tog se razloga nova metode profiliranja (engl. *whole cell profiling method*) razlikuje od ostalih pretraga u tome što ona procjenjuje aktivnost lijeka prema zajedničkom učinku svih staničnih procesa koristeći nekoliko metaboličkih i morfoloških završnih točaka. Nova ispitivanja DNA, RNA i proteina su prediktivna te bi, ukoliko su evaluirani prema principima medicine temeljene na dokazima, mogla služiti kao zlatni standard. Bolesnici, liječnici i sustav zdravstvenog osiguranja pozdravljaju prediktivne pretrage koje omogućuju racionalnu i ekonomičnu primjenu lijekova. Istovremeno, takav bi pristup (engl. *whole cell approach*) mogao riješiti probleme djelotvornosti s kojima se zdravstveni sustav susreće, a koji se odnose na pronalazak najboljeg načina raspodjele dostupnih sredstava u postupku traženja liječenja koji bi najbolje odgovarao svakom pojedinom bolesniku.

e-pošta: astavljenic@hkmb.hr

PL2-1

The impact of laboratory technological innovations on efficacy in health care

Stavljenić-Rukavina A

Croatian Chamber of Medical Biochemists, Zagreb, Croatia

The variety of new technology both in health care and society asks for critical assessment of efficacy and safety. This is particularly important in a view of changes in health system and overall need for more efficacy and evidence based application of new either diagnostic tests or innovative drugs. This overview is focused on technologies for POC and efficient use of potent new drugs in oncology based on laboratory testing.

The changes in organization of health system, tendency for lowering hospital care in favor of day care, home care of chronic diseases, continuity of care between hospital and home care, requires good communication between physician, patient and family. The advance in POC, non invasive control of some important analytes in human body has an essential role in home care, but requires the education of patients in application and quality control of diagnostic tests.

Today's treatments for cancer, namely the molecularly-targeted anti-cancer therapies are a vast improvement on treatments of ten years ago. However, the therapies do not work for everyone, at least not as effective and a test to determine the efficacy of these drugs in a patient could be the first crucial step in personalizing treatment to the individual. Additionally, most patients today are treated not with a targeted therapy drug alone but with a combination of chemotherapy drugs. Therefore existing DNA and RNA tests do not reflect the way cancer medicine is practiced today. Therefore the development of whole cell profiling method differs from other tests in that it assesses the activity of drug upon combined effect of all cellular processes using several metabolic and morphological end points. New DNA, RNA and protein-based tests are predictive ones and evaluated according evidence based principles might serve as gold standard model. Patients, physicians and health insurance welcomed predictive tests that allow for rational and cost-effective use of drugs. Simultaneously this whole cell approach might solve the problems confronting the healthcare system efficacy that is seeking ways to best allocate available resources while accomplishing the critical tasks of matching individual patients with the treatments most likely to benefit them.

e-mail: astavljenic@hkmb.hr

PL3-1

Medicina temeljena na dokazima - Koji ustroj istraživanja daje najbolji odgovor na moje pitanje?

Horvath AR

Zavod za laboratorijsku medicinu, Sveučilište u Szegedu, Medicinski fakultet, Klinički centar Albert Szent-Györgyi, Szeged, Mađarska

Pretraga je proces koji omogućuje korištenje neke metode u kontekstu određene bolesti, neke određene populacije, u neku određenu svrhu nakon koje će uslijediti određeni postupci. Laboratorijske pretrage imaju kliničku vrijednost jedino ukoliko pružaju korist bolesniku po prihvatljivom trošku. Prijenos bazičnih otkrića u kliničku primjenu (engl. *translational research*) ima za svoj cilj smanjiti rascjep između prepoznavanja bioloških biljega i dokazivanja njihove kliničke učinkovitosti te poboljšanja rezultata koji se odnose na bolesnika, organizaciju ili financijsku situaciju. Međutim, nove se laboratorijske pretrage puštaju na tržište s vrlo malo dokaza u prilog njihove valjanosti ili utjecaja u kliničkoj praksi. Budući da su resursi ograničeni, odluke temeljene na dokazima o primjeni dijagnostičkih intervencija trebaju ovisiti o dobro organiziranim i provedenim istraživanjima vrednovanja pretraga i procjene tehnologije. Vidjelo se da istraživanja iste pretrage mogu dati različite procjene dijagnostičke točnosti ovisno o izboru ustroja istraživanja i njegovom tijeku.

Nakon inicijalnog otkrivanja novih bioloških biljega treba pažljivo razmisliti o njihovoj svrsi, kontekstu i kliničkom putu njihove primjene, o populaciji i zdravstvenom sustavu gdje se ta pretraga namjerava provoditi te o potencijalnim posljedicama u kliničkoj praksi. Ne bi trebalo ispitivati niti jednu pretragu za koju je malo vjerojatno da će dati bolje kliničke rezultate ili mjerljivije ishode. Pretrage se trebaju procijeniti istraživanjem s pažljivo isplaniranim ustrojem koji odgovara postavljenom pitanju u svakom razvojnem stupnju. Strogost i širina procjene trebaju biti proporcionalne postavljenom pitanju i očekivanom odgovoru. Kod istraživanja valjanosti pretrage predlažu se sljedeći koraci:

Faza I: temeljno istraživanje o povezanosti bolesti s novim biološkim biljezima: odnosno, jesu li nalazi bolesnika s promatranim poremećajem različiti od nalaza kontrolne skupine? Ovo se pitanje najbolje obrađuje istraživanjem parova (engl. *case-control design*).

Faza II: kliničko istraživanje valjanosti pretrage: odnosno, hoće li se pretragom moći razlikovati bolesnici s promatranim poremećajem od onih bez tog poremećaja? To se pitanje treba obrađivati presječnim istraživanjem dijagnostičke točnosti (engl. *cross-sectional diagnostic accuracy*).

PL3-1

Evidence Based Laboratory Medicine - What study design answers my question best?

Horvath AR

Department of Laboratory Medicine, University of Szeged, Medical Faculty, Albert Szent-Györgyi Clinical Centre, Szeged, Hungary

A test is a procedure that makes use of an assay in the context of a particular disease, in a particular population, for a particular purpose, followed by specific action(s). Laboratory tests have clinical value only if they provide benefit to patients at acceptable costs. Translational research aims to decrease the gap between the identification of new biomarkers and proving that these are clinically effective and improve patient-centred, or organizational or economic outcomes. Nevertheless, new laboratory tests are often released to market with little evidence supporting their value or impact in clinical practice. Since resources are finite, evidence-based decisions about the use of diagnostic interventions should depend on well-designed and conducted test evaluation studies and technology appraisals. It has been shown, however, that studies of the same test can produce varying estimates of diagnostic accuracy depending on choices and conduct of study design.

After initial discovery of new biomarkers, careful consideration should be given to its purpose, the context and the clinical pathway for its application, the population and healthcare setting in which the test is intended to be used, and its potential consequences in clinical practice. No new test should be subjected to tedious evaluation if the test is unlikely to result in improved clinical actions or measurable outcomes. Test evaluation should be carried out with carefully planned study designs appropriate for the questions addressed at each stage of development. The rigour and depth of evaluation should be proportionate to the questions and expected outcomes being addressed. The below steps are proposed when investigating the value of testing:

Phase I: Basic research into the association of disease with the new biomarker: i.e., Do patients with the target disorder have different test results from normal individuals? This question is best addressed by case-control designs.

Phase II: Clinical research into the validity of tests: i.e., In patients suspected of having the target condition will the test distinguish those with and without the disorder? This question should be investigated in cross-sectional diagnostic accuracy studies in a representative spectrum of consecutively enrolled patients.

cy studies) u reprezentativnom nizu uzastupno uključenih bolesnika.

Faza III: klinička primjena/upotrebljivost testa: odnosno, prođu li bolje bolesnici (kada govorimo o zdravstvenim ishodima) kojima je napravljena ta pretraga ili oni kojima nije? Najprikladniji ustroj istraživanja za ovaj tip pitanja jest randomizirani kontrolirani pokus (engl. *randomized controlled trial*, RTC) ili meta-analiza višestrukih RTC.

Faza IV: utjecaj korištenja pretrage u praksi: odnosno, koje su etičke, pravne, financijske ili društvene implikacije te pretrage? To se pitanje najbolje može istražiti procjenom učinkovitosti uporabe suvremenih tehnologija u zdravstvu i zdravstvenoj zaštiti (engl. *health technology assessment*, HTA).

Metodologija zasnovana na dokazima ovih koraka već je pregledana te su zamke i moguće sistemske pogreške potkrepljene praktičnim primjerima.

Da zaključimo, odlučivanje o kliničkoj uporabljivosti i isplativosti laboratorijskih pretraga trebala bi se kretati od pristupa temeljenog na izračunu troškova prema pristupu temeljenom na valjanosti i dokazima pretrage. Kako bi se osigurala sigurnost bolesnika, potrebno je provesti multidisciplinarni proces odobravanja pretrage s odgovarajućom i razmjernijom procjenom rizika, prije njene pojave na tržištu.

e-pošta: ahorvath@clab.szote.u-szeged.hu

Phase III: Clinical application/utility of tests: i.e., Do patients who undergo the test fare better (in terms of health outcomes) than those who do not? The most suitable study design for this type of question is an RCT or meta-analysis of multiple RCTs.

Phase IV: Impact of testing in practice: i.e., What are the ethical, legal, financial or social implications of testing? This is best explored by health technology assessment.

The evidence-based methodology of these steps is reviewed and the pitfalls and potential biases in test evaluation studies are highlighted with practical examples.

In conclusion, clinical utilization and reimbursement for laboratory tests should move from a cost-based towards a value- and evidence-based approach. A multidisciplinary, more responsive and proportionate risk assessment during pre-market approval of new tests is needed to ensure patient safety.

e-mail: ahorvath@clab.szote.u-szeged.hu

S0 – Predkongresni simpozij: U korak s promjenama – laboratorijska dijagnostika danas i sutra

PS00-1

Izazovi pred kliničkim laboratorijem u okolini koja se stalno mijenja

Müller M

Austrijsko društvo za osiguranje kvalitete i standardizaciju, Beč, Austria

Tijekom posljednjih 10 ili 15 godina u našoj su se političkoj, društvenoj, ekološkoj i ekonomskoj okolini dogodile brojne promijene. Očigledno je da se taj trend ne može zaustaviti te da se može primjetiti i u sustavu zdravstvene zaštite, gdje ćemo možda biti suočeni s dramatičnim promjenama i razvojem događaja u narednom desetljeću.

Što se laboratorija tiče, jedan od najtežih izazova jest ogroman i još uvijek rastući broj laboratorijskih pretraga koje se moraju provesti, vrednovati i klinički protumačiti. U mnogim se slučajevima te pretrage izvode 24 sata dnevno, 7 dana u tjednu. To je postalo sve teže, budući da je još uvijek prisutan financijski pritisak koji zbog smanjenja troškova vodi ka smanjenju broja zaposlenih - u brojnim slučajevima na štetu stručno obrazovanog kadra. S druge strane, potreba za bržim dovršavanjem posla, za dostupnim i kvalitetnim pretragama sve je veća. Kako bi se mogli nositi s tim izazovima, laboratoriji se moraju usredotočiti na četiri glavna područja unutar okvira bolničke njege i zdravstvene zaštite.

1. Analitički testovi: Broj novih testova i parametara i dalje će rasti. Bit će potrebno dokazati njihovu upotrebljivost i primjenu što zahtjeva kliničku procjenu. Struktura novih sustava morat će biti fleksibilna i modularna, kako bi se uspješno moglo odgovoriti na razne zahtjeve velikih i manjih specijaliziranih laboratorija. Online sustav kontrole kvalitete pomoći će u osiguranju kontrole kvalitete na licu mjesta te bi trebao preći u standard svakog laboratorija.
2. Tijek rada i logistika: Svaki laboratorij mora imati jasno definiranu prijeanalitičku fazu postupanja s uzorcima unutar i izvan laboratorija, započevši od sakupljanja uzoraka pa sve do mjerenja. Treba se uspostaviti integracija nalaza pristiglih iz udaljenih ili odvojenih laboratorija. Moraju se uskladiti svi elementi kao što su transport uzoraka i njihova pohrana, prijenos nalaza i komunikacija te logistika reagensa i otpada.
3. Rezultati i dijagnoza: Automatizirana validacija nalaza i tumačenje postat će neophodno za učinkovito vođenje laboratorija. Sve je više potrebna integracija stručnih programskih sustava (engl. *rule engines and knowledge base-solutions*) kao podrška u donošenju

S0 – Precongress symposium: Keeping pace with ongoing changes – laboratory diagnosis today and tomorrow

PS00-1

The challenges for the clinical laboratory in a changing environment

Müller M

Austrian Society of Quality assurance and Standardisation, Vienna, Austria

During the past 10 or 15 years many changes in our political, social, ecological and economical environment have occurred. This trend can obviously not be stopped and is also seen in the health care environment, where we might be facing dramatic changes and developments in the coming decade.

As for the laboratory, one of the most striking challenges is the overwhelming and still increasing number of tests to be performed, validated and clinically interpreted every day. In many cases these tests must be performed 24hrs per day, 7 days a week. This becomes even more difficult since the cost pressure still remains, leading to cost savings in terms of reduction in personnel. Many times at the expense of eliminating well educated personnel. On the other side, there is a steadily growing demand for shorter turn around times, availability and quality of tests. To cope with these challenges, the lab has to focus on four major fields within the hospital or health care framework.

1. Analytics: The number of new tests and parameters will further increase. The proof of their clinical utility and application will be an issue and requires clinical evaluations. New systems must involve a flexible and modular architecture to cope with the different requirements in large and smaller specialised labs. Online quality control systems will help to ensure a real-time quality control and should become the standard in each lab.
2. Workflow and logistics: A clear strategy for the pre-analytical phase of samples inside and outside the lab, starting from sample collection to the measurement must be defined in each lab. Integration of results from remote or satellite labs has to be established. All items related to sample transport and storage, result transmission and communication as well as logistics of reagents and disposables must be organised.
3. Results and diagnosis: Automated result validation and interpretation will become necessary to effectively run a lab. Rule engines and knowledge base-solutions (expert system) need to be implemented increasingly to support the decision making in the lab.

odluka u laboratoriju. Trebaju se uspostaviti stručne mreže s brzim komunikacijskim linkovima preko mreže telemedicine i interneta. Također se mora razmisliti i o pitanjima sigurnosti elektronskih podataka o bolesnicima te elektronskoj arhivi.

4. Bolnička njega i zdravstvena skrb: Okolina u kojoj laboratorij djeluje postaviti će specifične zahtjeve kao što su komunikacija između laboratorija (engl. *laboratory information system*, LIS) i vanjskih partnera integrirana u mrežu o skrbi za bolesnike. Daljnja konsolidacija bolničkih laboratorijskih usluga i najam vanjskih usluga iz privatnih ustanova zdravstvene skrbi, specijalizacija i implementacija rješenja prilagođenima svakom bolesniku osobno biti će od ključnog značaja kako bi se ispunili individualni zahtjevi.

Što se tih četiri područja tiče, već postoje pozitivni primjeri kako laboratorij može odgovoriti na te izazove. U svom ću predavanju izložiti primjere koji pokazuju da vizija budućnosti laboratorija od jučer već danas postaje stvarnost.

e-pošta: mathias.mueller@oequasta.at

PS00-2

Glavni izazovi za medicinu u 21. stoljeću

Blaton V

Katoličko sveučilište Leuven, Zavod za kliničku kemiju, Brugge, Belgija

Poziv Hrvatskog društva medicinskih biokemičara da održim predavanje u čast proslave dugogodišnje karijere prof. Elizabete Topić na području laboratorijske medicine, potaknuo me na razmišljanje o svojoj karijeri na polju medicinske biokemije i medicine. Impresionira me i očarava jedna dominantna i uvijek iznova prisutna istina – kako nekoliko dobrih ideja i moć znanosti mogu radikalno promijeniti način života.

Godina 1965. kada se odlučila baviti farmacijom bila je važna godina za Elizabetu. Terapijska medicina je u to vrijeme bila vrlo primitivna, gledano prema današnjim standardima. Tada nije bilo blokatora kalcija ili inhibitora ACE, nije bilo statina za kolesterol niti Porzaca protiv depresije niti injekcija protiv hepatitisa i prehlade. Nije bilo transplantacije koštane srži, jetre ili srca. Tada nije bilo operacija ugradnje koronarne prenosnice, nije bilo pregleda kompjuterskom tomografijom niti magnetnom rezonancom. Alzheimer je bio vrlo rijedak poremećaj. AIDS je bila nepoznata bolest, u svijetu je bilo svega nekoliko fotokopirnih aparata, a McDonald's još nije postojao. To me sve vraća zaključku da su tri događaja unijela promijene

Expert networks with fast communication links using telemedicine and internet connections will be established. Security issues of electronic patient data and data archives need to be considered.

4. Hospital and health care: The environment in which the lab is embedded will have specific demands such as communication between the lab (LIS) and external partners in integrated patient care networks. Furthermore consolidation of hospital lab services and in sourcing from private health care providers, specialisation, and implementation of tailor made solutions will be essential to fulfil individual requirements.

As for these four areas, there are already good examples on how a lab can cope with these challenges. I will present examples that demonstrate the future lab vision of yesterday has already started to become reality today.

e-mail: mathias.mueller@oequasta.at

PS00-2

The great issues for medicine in next century

Blaton V

KU-Leuven, Department of Clinical Chemistry, Brugge, Belgium

The opportunity to present this lecture on invitation by the Croatian Society of Medical Biochemists in celebration of the long career of Prof Elizabeta Topic in Laboratory Medicine caused me to reflect back on my own career in Medical Biochemistry and medicine. I am impressed and astonished by one dominant and recurring theme - how a few good ideas and the power of science can radically transform the way of live.

1965 a very important year for Elizabeta - her choice Pharmacy therapeutic medicine was very primitive by today's standards. There were no calcium blockers or ACE inhibitors, no statines for cholesterol and no Prozac for depression and no vaccines against hepatitis and influenza. There were no bone marrow transplantation, no liver or heart transplants. Coronary bypass operations did not exist. There were no CAT scans or MRI's. Alzheimer was a very rare disorder. AIDS was unknown and there were only a couple Xerox machines over the world and finally there were no McDonald's restaurants. And bring me to the theme that the world in general and the world of

u svijet i medicinu. Hamburgeri, čipovi i geni. Elizabeta je radila s bolestima vezanima za gene. Dopustite mi da Vam objasnim.

Genij osnivača Big Maca odgovorio je na ljudsku želju da im se sve servira unutar 60 sekundi te je osnovavši lanac restorana brze hrane potpuno promijenio način života i u njega uveo metabolički sindrom. Bez mikročipova ne bismo imali telefone u autu, bankovne i kreditne kartice, osobna računala. Gotovo u isto vrijeme, 1966. godine dogodila se prekretnica u povijesti gena, genetski je kod bio potpuno dešifriran. Godine 1972. otkrivena je tehnika rekombinantne DNA. Naša nova snaga u manipulaciji genima dovela je do novih saznanja o kompletnim sekvencama DNA ljudskog genoma. Velika znanstvena otkrića uvijek vode primjenama korisnim društvu. Kao što su čipovi doveli do rođenja industrije mikročipova, geni su doveli do stvaranja biotehnoške industrije, koja je nakon 25 godina postala izuzetno impresivna. Biotehnolozi su preuzeli stil koji podsjeća na raniju revoluciju u umjetnosti, zvanu nadrealizam, oni žive i misle u svijetu mašte i snova. Pogledajmo djela belgijskog umjetnika René Magritte „Dvorac na nebu“ (*The castle in the sky*) i „Pronicljivo“ (*Clairvoyance*). Što će biti medicina u 2099. godini? Nema predviđanja osim onog „očekuj neočekivano“.

Elizabeta je naporno radila na kontinuiranom školovanju kojemu su bile potrebne daljnje reorganizacije i temeljne promjene. Problem je što mi u našoj struci ne preuzimamo dovoljno prednosti velikih tehničkih dostignuća, koja nam pružaju znanstvenici s područja temeljne znanosti. Potrebna su nam istraživanja koja se više okreću bolesnicima nego bolestima. Ovom bi prilikom želio proglasiti njezin rad važnim za budućnost.

e-pošta: victor.blaton@skynet.be

medicine have been radically changed by three turns of events. Burgers, chips and genes. Elizabeta was also involved in genes related diseases. Let me explain.

The genius of the founder of the Big Mac was an answer that the people wanted to be served in 60 seconds, creating fast food restaurants and change completely the way of live and introducing the metabolic syndrome. Without microchips there were no car phones, no cash cards and no personal computers. Around the same time 1966 was a turning point in the history of the genes, the genetic code was completely deciphered, in 1972 the recombinant technique was discovered. Our new power to manipulate genes led to the knowledge of the complete DNA sequence of the human genome. Great scientific discoveries always lead to applications that benefit the society. As chips led to the birth of the microchip industry genes has led to the creation of the biotechnology industry, which after 25 years has been extremely impressive. The biotechnologists have assumed a style that is reminiscent of an earlier revolution in art called surrealism, they live and think in a world of fantasy and dreams. Let us consider the work of the Belgian artist René Magritte “The castle in the sky” “Clairvoyance”. What will be medicine in 2099 no prediction however “Expect the unexpected”.

Elizabeta worked hardly on continuous education which need further reorientation and fundamental changes. The problem is that we not take enough advantages in our profession of the enormous technological breakthroughs that the basic scientists are giving us, we need more patient oriented research than disease oriented. I would like to place her work as important for the next future.

e-mail: victor.blaton@skynet.be

PS00-3

Sadašnjost i budućnost dijagnostike endokrinih oboljenja

Kovacs GL

Zavod za laboratorijsku medicinu, Sveučilište u Pečuhu, Pečuh, Mađarska

Kada je autor započeo svoju karijeru 1972. godine, kalorimetar se tek nedavno bio prestao koristiti u endokrinom laboratoriju. U zadnjih se 30 godina endokrinološki laboratorij dramatično promijenio, a od tada još i više. Mnogi od glavnih principa vođenja kliničkog endokrinološkog laboratorija koji se danas uzimaju zdravo za gotovo

PS00-3

The present and future of endocrine laboratory diagnostics

Kovacs GL

Institute of Laboratory Medicine, University of Pecs, Pecs, Hungary

When the author began his career in 1972 he found a calorimeter in the endocrine lab put out of use just a few years before. The hormone laboratory has changed dramatically since the last 30 years and even more since. Many of the major principles governing clinical endocrinology taken for granted today were established during the

uspostavljeni su tijekom posljednjih 50 godina. U stvari, tijekom tog razdoblja, dvanaest je osoba podijelilo Nobelovu nagradu za otkrića direktno povezana s endokrinološkim i hormonskim metodama. Iz obilja informacija sakupljenih tijekom pola stoljeća, autor se odlučio za tri teme koje su posebno utjecale na endokrinološku praksu te stoga i na hormonska mjerenja. Te tri teme su otkriće i identifikacija moždanih neuropeptida, posredovanje hormonalnog odgovora u izvanstaničnim i unutarstaničnim receptorima i evolucija koncepta slobodnih hormona. Autor ne smatra da smo dovoljno dalekovidni ili mudri kako bismu mogli procijeniti kako će endokrinološki laboratorij (ako će uopće postojati) izgledati za samo dvadeset godina. Neki elementi koje i sada koristimo, metode i automatski analizatori vjerojatno će i dalje postojati. Možemo očekivati poboljšanja u eliminiranju interferencija uzrokovanih heterofilnim antitijelima u imunološkim metodama. Problem križne reaktivnosti malih molekula će vjerojatno biti riješen tehnologijom tandemske spektrometrije masa, umjesto imunološkim metodama. Nema sumnje da je broj definitivnih metoda temeljenim na izotopnoj dilucijskoj masenoj spektrometriji pokazuje kako je masena spektrometrija superiornija u odnosu na imunološke metode kada su u pitanju male molekule. Molekularna je biologija već našla svoj put na područje endokrinologije s identifikacijom mutacija odgovornih za razne podtipove multiple endokrine neoplazije, kongenitalne adrenalne hiperplazije ili gotovo svake druge genetski određene endokrine bolesti. Mjerenja mRNA za tireoglobulin metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom nakon reverzne transkripcije (engl. *reverse transcription-polymerase chain reaction*, RT-PCR) već se rabe kod kontrolnih pregleda bolesnika s difereciranim karcinomom štitnjače. Ispitivanja gena i određivanje mRNA raznih kalikreina predloženo je kao prognostički biljeg za mnoge vrste karcinoma. Identifikacija mutacija u tradicionalnom receptoru estrogena danas ukazuje na rak dojke. Uloga laboratorijskog specijaliste kod hormonskih pretraga također se promijenila u zadnjih 50 godina. Mnogo godina su laboratorijski stručnjaci sami pripremali svoje reagen-se. Danas, klinički biokemičari ne mogu mijenjati protokole proizvođača, a da pritom ne riskiraju da će biti pravno sankcionirani. Razvoj daljnjih metoda bit će koncentriran u istraživačkim i industrijskim laboratorijima. Naša će uloga biti više posvećena objašnjavanju ograničenja tih metoda kliničarima koji su do grla zatrpani svim vrstama informacija i – što je najvažnije – konzultiranju s njima.

e-pošta: gabor.l.kovacs@aok.pte.hu

last 50 years. In fact, during this period, twelve individuals received or shared Nobel Prizes for discoveries directly related to endocrinology and hormone assays. From the tremendous amount of information gathered during half a century, the author has selected three topics that had a particular impact on the practice of endocrinology and therefore on hormone measurements. These three topics are the discovery and identification of brain neuropeptides, the mediation of hormonal action through extra- and intracellular receptors, and the evolution of the concept of free hormones. The author does not feel that we have sufficient foresight or wisdom to extrapolate what endocrinology laboratories (if they still exist) will look like in only 20 years from now. Part of what we already use, assay formats and automated analyzers, will probably still be around. We may expect improvements in the recipes to eliminate interferences caused by heterophil antibodies in immunoassays. The problems of cross reactivity for small molecules will eventually be solved by using tandem mass spectrometry technology instead of immunoassays. There is no doubt that the number of definitive methods based on isotope dilution mass spectrometry for biochemical measurements reflects that mass spectrometry is superior to immunoassays for small molecules. Molecular biology has already found its way in the endocrinology field with the identification of mutations responsible for various sub-types of multiple endocrine neoplasia, congenital adrenal hyperplasia, or almost any other genetically determined endocrine disease. The measurement of thyroglobulin messenger RNA by RT-PCR is already used in the follow-up of patients with differentiated cancer of the thyroid. Measurement of genes and mRNAs for different kallikreins has been proposed as prognostic markers for many cancers. Identification of mutations in the traditional estrogen receptor is now indicated for breast cancer. The role of the laboratory specialist in hormone testing has also changed in the last 50 years. For many years, laboratory specialists prepared their own kits. Now, clinical biochemists can make no changes to manufacturers' protocols without risking legal action. Assay development will be concentrated within research and manufacturers' laboratories. Our role will be more devoted to explain the limitations of these assays to clinicians submerged by all kinds of information and – most importantly – to consult with them.

e-mail: gabor.l.kovacs@aok.pte.hu

PS00-4

Laboratorijska medicina u budućnosti: čovjek je najvažniji

Stavljenić-Rukavina A

Hrvatska komora medicinskih biokemičara, Zagreb

Preispitivanje dosega laboratorijske medicine u proteklom i prvom desetljeću ovog stoljeća upućuje na stalni uspon razvoja struke, kako u širenju dijagnostičkih mogućnosti, tako i tehnološkom napretku infrastrukture laboratorija. Međutim, zdravstveni sustav, posebno javnozdravstvena zaštita, cijeni u najvećem opsegu nekoliko ključnih domena kojima je laboratorijska medicina doprinijela sigurnosti dijagnoze i liječenja bolesti današnjice, sigurnosti bolesnika, racionaloj potrošnji u zdravstvu i razvoju medicine zasnovane na dokazima. Te domene prepoznajemo kroz kritičku evaluaciju primjene dijagnostičkih testova u medicini temeljenoj na znanstvenim principima, primjenu novih tehnologija koje omogućavaju brzi odgovor na pitanje liječnika „Što je mom pacijentu i liječim li ga efikasno?“, uspostavljanje sustava poboljšanja kvalitete rada te unapređenje edukacije stručnjaka, bolesnika i javnosti.

Pojedinci, priznati stručnjaci u području laboratorijske medicine, ovisno o mjestu djelovanja dali su i daju svoj doprinos u razvoju struke i medicinsko-biokemijske djelatnosti. Kroz taj rad, ne samo da unapređuju struku i medicinu kojoj služe, već ulaganjem u svoje znanje i stičući nove vještine daju određeni smjer i primjer onima koji dolaze.

Laboratorijska medicina budućnosti okrenuta je preispitivanju efikasnosti svog područja rada u okviru medicine zasnovane na dokazima i principima maksimalne zaštite bolesnika od pogrešne dijagnoze i liječenja. Dok je za višu razinu efikasnosti potrebna nova tehnologija, kraći TAT, veća brzina odgovora na pitanja kliničara i pacijenata, odgovor na pitanje sigurnosti bolesnika je mnogo složeniji i zahtjeva multidisciplinarni pristup osobito u bolničkoj praksi. Sigurnost bolesnika u dijagnozu i liječenje je jedan od prioritetnih projekata, kako Svjetske zdravstvene organizacije, tako i nacionalnih strategija reforme zdravstvenih sustava. U tome su ključni vodeći i prepoznati stručnjaci iz područja laboratorijske dijagnostike, sposobni za procjenu dometa svoje struke i odlučni u komunikaciji sa svim ostalim medicinskim strukama koje skrbe o bolesniku. Kroz prikaz doprinosa profesorice Elizabete Topić u pojedinim domenama razvoja struke i medicinsko-biokemijske znanosti, u ovom će se radu analizirati dosezi struke u prethodnom razdoblju i sagledati razvoj u slijedećem.

e-pošta: astavljenic@hkmb.hr

PS00-4

Laboratory medicine in the future: people are most important

Stavljenić-Rukavina A

Croatian Chamber of Medical Biochemists, Zagreb, Croatia

Review of the scope of laboratory medicine in the last 2 decades shows a constant development of the profession by expanding diagnostic possibilities as well as technological progress of laboratory infrastructure. However, the healthcare system, especially the public healthcare, includes several key issues in laboratory medicine which have contributed to accuracy of diagnosis and treatment of frequent diseases, patient's safety, rational healthcare consumption and development of evidence-based medicine. Those issues are recognized through critical evaluation of diagnostic tests application in medicine based on scientific principles, application of new technologies which provide prompt response to physician's question "what is wrong with my patient and am I treating him/her efficiently", establishment of quality improvement system and upgrade in education of professionals, patients and public.

Some individuals, recognized experts in laboratory medicine, depending on their working place, give their contribution to development of medical biochemistry profession. Through their work they not only promote medicine to which they serve, but also by striving in their knowledge, they set a new direction and give examples for posterity.

Laboratory medicine of the future is focused on reviewing its efficiency in scope of evidence-based medicine and principles of the best possible patient's protection from wrong diagnosis and treatment. While the higher level of efficiency requires new technology, shorter TAT, higher rate of responses to clinicians and patients questions, the answer to the question of patients' safety is much more complex and requires a multidisciplinary approach especially in hospital practice. Patients' reliability in the diagnosis and treatment is one of the priority projects of the World Health Organization and national strategies of health system reform. It is very important that recognized experts in the field of laboratory diagnostics are capable of assessing scope of their profession and are determined to communicate with all other medical professionals who care about the patients. Through the overview of professor's Elizabeta Topić contribution in certain professional area and medical biochemistry, biochemistry this lecture will analyze the state of the art of the past and its development in the future.

e-mail: astavljenic@hkmb.hr

S01 – Laboratorijska imunologija**S01-1****Imunodijagnostika paraneoplastičkog sindroma**

Malenica B

Zavod za imunologiju i referentni centar za kliničko-laboratorijsku imunodijagnostiku imunoloških i hematoloških bolesti Ministarstva zdrastva RH i Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Paraneoplastički neurološki sindromi (PNS) veoma rijetko se javljaju u bolesnika sa stanovitim zloćudnim tumorima, a nisu uzrokovani izravnim širenjem ili metastaziranjem tumora, popratnim infekcijama, krvnožilnim ili metaboličkim poremećajima, niti neurotoksičnošću standardnih vidova liječenja tumora, kao što su radioterapija i kemoterapija. Predmnijeva se da je imunosna reakcija važan čimbenik u patogenezi paraneoplastičkih sindroma. Naime, autoimunosnu reakciju potaknula bi ektopička ekspresija normalnih tkivnih neuronskih antigena u tumorskim stanicama, a efektorski mehanizmi te protutumorske imunoreakcije (stanični i humoralni) protiv takvih „onkoneuralnih“ antigena prouzročili bi oštećenja normalnog živčanog tkiva sa posljedičnom kliničkom simptomatologijom paraneoplastičkih sindroma u bolesnika sa stanovitim histološkim tipom zloćudnog tumora. Klinički simptomi mogu biti posljedica oštećenja središnjeg i perifernog živčanog sustava. Tehnikom serološkog pretraživanja ekspresijske knjižnice komplementarne DNA (cDNA) definirana su specifična antitijela protiv brojnih onkoneuralnih autoantigena. U laboratorijskoj imunodijagnostičkoj praksi ta se antitijela detektiraju indirektnom imunofluorescencijom (IIF) na tkivnim preparatima malog mozga, perifernog živca i fetalnog crijeva primata na kojima pokazuju karakteristični uzorak imunofluorescencije (pregledni test) i metodom Westernblota koja otkriva vezanje specifičnog antitijela za ciljni antigen (potvrđni test). Dobro okarakterizirana antitijela protiv onkoneuralnih antigena prepoznaju proteine u neuronskoj jezgri (anti-Hu-ANNA-1; anti-Ri-NOVA1, NOVA2-ANNA-2; anti-MA2) i proteine u neuronskoj citoplazmi (anti-Yo-CDR2-PCA-1; anti-Tr-PCA-Tr; anti-CV2-CRMP5; anti-amfifizin). Sva spomenuta antineuronska antitijela sastavni su dio dijagnostičkih kriterija na temelju kojih se postavlja „konačna“ ili samo „vjerovatna“ dijagnoza paraneoplastičkog sindroma u dotičnog bolesnika. Nalaz stanovitog antitijela, ili više njih istodobno, karakterizira određeni paraneoplastički sindrom i zloćudni tumor koji je najčešće s njim udružen.

e-pošta: b_malenica@yahoo.com

S01 – Laboratory immunology**S01-1****Immunodiagnosis of paraneoplastic syndrome**

Malenica B

Department of Immunology and Referral Center for Clinical-laboratory Immunodiagnosis of Immunological and Hematological Diseases, Ministry of Health, Republic of Croatia, and Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb Clinical Hospital Center, Zagreb, Croatia

Paraneoplastic neurological syndromes (PNS) occur very rarely in patients with cancer provided that they are not caused by invasion of the tumor or its metastases, by infection, ischemic or metabolic disorders, or neurotoxicity of the standard cancer treatments such as a radiotherapy and chemotherapy. Immunologic factors appear important in the pathogenesis of PNS because anti-neuronal autoantibodies and T-cell responses against nervous system antigens have been defined for many of these disorders. Immunologic response is elicited by ectopic expression of neuronal antigens by the tumor. The clinical presentation of neurological symptoms is caused by autoimmune reactions directed against antigens common to both the cancer and the nervous system, designated as „onconeural“ antigens. Paraneoplastic neurological syndrome can affect any part of the central and peripheral nervous system. In recent years, a few specific antibodies directed against different „onconeural“ antigens have been identified and molecularly characterized by serologic screening of complementary DNA (cDNA) expression libraries of patients with PNS. In routine laboratory immunodiagnosis, these autoantibodies are detected by indirect immunofluorescence (IIF) on primate tissue preparations of cerebellum, peripheral nerve and fetal intestine (screening test) and by Western blot analysis with specific recombinant antigens (confirmation test). Diagnostic paraneoplastic autoantibodies directed against „onconeural“ antigens recognize neuronal nuclear proteins (anti-Hu-ANNA-1; anti-Ri-NOVA1, NOVA2-ANNA-2; anti-MA2) and neuronal cytoplasmic proteins (anti-Yo- CDR2-PCA-1; anti-Tr-PCA-Tr; anti-CV2-CRMP5; anti-amphiphysin). All these paraneoplastic autoantibodies are included in diagnostic criteria in reaching decision between „definite“ and only „possible“ paraneoplastic neurological syndromes. One or more positive neuronal nuclear or neuronal cytoplasmic autoantibodies observed in patients with paraneoplastic disorders are connected with specific neurological syndrome and with patient's neoplasm.

e-mail: b_malenica@yahoo.com

S01-2

Uloga autoantitijela u ranom otkrivanju karcinomaKulić A¹, Vrbanec D²¹Zavod za patofiziologiju, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb²Klinika za onkologiju, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Idealni tumorski marker bio bi onaj koji bi se mogao odrediti jednostavnim testom iz krvi, kojim bi se mogao otkriti rak i čija razina u krvi bi korelirala sa stadijem i napredovanjem maligne bolesti. Tijekom posljednjih trideset godina različiti proteini, hormoni i enzimi su se koristili kao tumorski markeri. Međutim, zbog nedostatne osjetljivosti i specifičnosti niti jedan od njih nije zadovoljio kriterije za idealni tumorski marker. Otkriće različitih protutijela u serumu bolesnika s tumorima otvorilo je nove mogućnosti u dijagnostici raka. Ta protutijela su nađena u krvi bolesnika s različitim vrstama tumora. Čimbenici koji mogu imati ulogu u patogenezi autoantitijela u bolesnika s rakom su slijedeći: imunosna reakcija domaćina na tumor-specifične antigene, destrukcija tumorske stanice zbog koje dolazi do otpuštanja antigena i poremećaji regulacije imunosnog sustava domaćina potaknuti neoplastičkim procesom. Regulacija i lokalizacija različitih proteina može biti različita u tumorskim stanicama u odnosu na normalne stanice. Tako su dva tipa enzima cAMP-ovisne protein kinaze A (PKA) u normalnim stanicama smješteni isključivo unutar stanice, dok maligne stanice PKA izlučuju u medij u kojem rastu. Taj secernirani oblik je nazvan ekstracelularna protein kinaza A (ECPKA) i povezan je s imunosnom reakcijom domaćina. Protutijela na ECPKA mogu se utvrditi korištenjem enzimskog imunotesta (EIA). Ta protutijela su utvrđena u različitim tumorima uključujući karcinome pluća, dojke i prostate. EIA metodom mjere se IgG protutijela na ECPKA. Ta metoda je pokazala 90% osjetljivost i 87% specifičnost, dok enzimski test kojim se određuje sama PKA pokazuje 83% osjetljivosti i 80% specifičnosti. Veća osjetljivost i specifičnost pokazana je i u istraživanjima autoantitijela protiv drugih tumorskih markera (VEGF, CA125, AFP) u odnosu na određivanje samih antigena. Pokazano je i da detekcija autoantitijela može biti korisna u razlikovanju povišene razine tumorskih markera u bolesnika s karcinomom u odnosu na povišenje uvjetovano upalom. Određivanje autoantitijela u serumu bolesnika može doprinijeti ranom otkrivanju maligne bolesti. Prednosti ovog pristupa u odnosu na dosadašnje je veća osjetljivost i specifičnost.

e-pošta: ana.kulic1@zg.t-com.hr

S01-2

The role of autoantibodies in early detection of cancerKulić A¹, Vrbanec D²¹Department of Pathophysiology, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia²Department of Medical Oncology, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

An ideal tumor marker would be assessable by simple blood test, would have potential to detect cancer and its levels would correlate with the stage and progression of malignant disease. During past thirty years many proteins, hormones and enzymes have been used as tumor markers. However, due to the lack of sensitivity and specificity no one of these markers could fulfill the criteria of ideal tumor marker. Detection of various autoantibodies in serum of cancer patients has opened a new gateway for cancer diagnosis. These antibodies have been detected in serum of patients with cancer of various cell types. The factors that may have impact in pathogenesis of these autoantibodies include: host immune response to tumor-associated antigens, antigen release from destroyed cells and immune dysregulation of the host induced by neoplastic process. The regulation and localization of various proteins may be different in tumor cells in comparison with their normal counterparts. For example two types of cAMP-dependent protein kinase (PKA) are localized strictly intracellularly in normal cells, while PKA is secreted in the medium by various cancer cells. That secreted form is called extracellular PKA (ECPKA) and it is accompanied with host immune response. Autoantibodies to ECPKA could be detected in serum using immunoassay method (EIA). Autoantibodies against ECPKA have been detected in various tumors including carcinoma of the lung, breast and prostate. EIA method measures the anti-IgG autoantibodies to ECPKA. This method has shown 90% sensitivity and 87% specificity compared to the 83% sensitivity and 80% specificity of the method that detects directly PKA (PKA enzymatic assay). Higher sensitivity and specificity has been observed in testing various other autoantibodies to tumor markers like VEGF, CA125 and AFP, in comparison with conventional methods. Detection of autoantibodies may be helpful in distinguishing the elevated levels of tumor markers caused by cancer from elevated levels due to inflammation. In conclusion, detection of autoantibodies in serum may be valuable new approach in early diagnosis of malignant disease. The advantages of this approach are its increased sensitivity and specificity.

e-mail: ana.kulic1@zg.t-com.hr

S01-3

Novosti u serološkoj dijagnostici celijakije

Tešija Kuna A

Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Celijakija je kronična upalna autoimuna bolest koju u genetski predisponiranih osoba uzrokuje gluten (mješavina proteina prisutnih isključivo u žitaricama), uz djelovanje drugih okolišnih čimbenika. Bolest karakterizira atrofija resica sluznice tankog crijeva, povećanje broja intraepitelnih limfocita i hiperplazija kripti između resica. Uslijed izrazito raznolike kliničke prezentacije, koja varira od asimptomatske do klasičnog oblika sa simptomima teške malapsorpcije, celijakija je bolest koja često biva neprepoznata pa je stoga njezina prevalencija u općoj populaciji uvelike podcijenjena. Iako je serologija prijeko potreban segment u dijagnostičkoj evaluaciji celijakije, karakterističan histološki nalaz u biopsiji sluznice tankog crijeva još predstavlja zlatni standard za potvrdu dijagnoze. Razvojem novih testova i tehnologija unaprijeđeno je serološko testiranje pri sumnji na celijakiju. Danas je određivanje antitijela usmjerenih na nativni gliadin (AGA) izgubilo svoju ulogu u dijagnostici celijakije zbog nedovoljne osjetljivosti i specifičnosti. Nove preporuke za probirni panel na celijakiju uključuju mjerenje koncentracije ukupnog IgA (u svrhu isključivanja IgA deficita) te koncentracije IgA autoantitijela na tkivnu transglutaminazu (anti-tTG), testom u kojem se kao antigen koristi rekombinantni ili pročišćeni humani tTG. Iako se pokazalo da antiendomizijska autoantitijela (EMA) imaju malo veću specifičnost za celijakiju u odnosu na anti-tTG, interpretacija rezultata testa je subjektivna i stoga se sve češće zamjenjuje s anti-tTG testom. Oba testa imaju vrlo visoku negativnu prediktivnu vrijednost, a pozitivan rezultat identificira pacijente kojima se preporučuje biopsija tankog crijeva u svrhu potvrde celijakije. U slučaju dokazanog IgA deficita preporučuje se mjerenje anti-tTG IgG klase. Nedavno su opisana specifična antitijela usmjerena na glijadinske peptide deamidirane tkivnom transglutaminazom (DGP). Prema trenutnim saznanjima, anti-DGP test ima podjednaku osjetljivost i specifičnost za celijakiju kao i anti-tTG, a dijagnostički je najkorisniji ponajprije u slučaju negativnog ili graničnog rezultata anti-tTG uz izrazitu kliničku sumnju na celijakiju. S druge strane, anti-DGP antitijela pokazala su se boljim biljegom za kontrolu pridržavanja bezglutenske prehrane i oporavka crijevne sluznice u odnosu na anti-tTG.

e-pošta: andrea.kuna@gmail.com

S01-3

News in serologic diagnosis of celiac disease

Tešija Kuna A

University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Celiac disease (CD) is a chronic inflammatory autoimmune disease induced in genetically susceptible individuals by dietary gluten (a mixture of proteins present exclusively in cereals) with interaction of other environmental cofactors. Disease is characterized by flattened villi on the small bowel mucosa, increased number of intraepithelial lymphocytes and crypt hyperplasia. Due to the diverse clinical heterogeneity ranging from asymptomatic to severely malnourished patients, CD has been seriously underdiagnosed worldwide.

Serology represents an essential part in the diagnostic evaluation of CD but still, histology of small bowel biopsies is regarded as the gold standard for diagnosis. The development of new tests and technologies has improved the testing options for CD. Nowadays, the measurement of antibodies against native gliadin (AGA) in diagnosing CD becomes obsolete owing to its lack of sensitivity and specificity. The new recommended screening panel for CD comprise the measurement of total IgA (in order to exclude the IgA deficiency) followed with measurement of IgA class anti-tissue transglutaminase (anti-tTG) autoantibodies, utilizing recombinant or purified human tTG as antigen in test. Although historical anti-endomysial autoantibodies (EMA) are slightly more specific than anti-tTG, the interpretation of the test result is affected by subjectivity and therefore mostly replaced by tTG test. Both tests have very high negative predictive value, while positive test results identify patients that should undergo small-bowel biopsy in order to confirm CD. In the case of IgA deficiency, measurement of anti-tTG-IgG is recommended. Recently, specific antibodies against synthetic peptides derived from partially deamidated gliadin peptides (DGP) through the action of tTG, were described. According to present data, anti-DGP test has comparable sensitivity and specificity as that of anti-tTG for CD and should be used in the event of anti-tTG negative or equivocal result in patients with strong clinical suspicion of CD. On the other hand, anti-DGP test perform better than anti-tTG in the assessment of dietary compliance and mucosal recovery.

e-mail: andrea.kuna@gmail.com

S01-4

Laboratorijska dijagnostika autoimunih bolesti – nove tehnologije, stare dileme

Salamunić I

Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Split, Split

Autoimune bolesti posljedica su imunološke reakcije protiv vlastitih antigena. Karakterizira ih pojava specifičnih autoantitijela. Dijagnoza se postavlja na temelju kliničkih simptoma i detektiranjem specifičnih autoantitijela.

U rutinskom radu imunološkog laboratorija koriste se brojne tehnike i metode za dokazivanje ponajprije autoantitijela, a rjeđe antigena. Konvencionalne metode u detekciji autoantitijela javljaju se 1957. godine, te su od tada razvijane brojne tehnike i metode koje se primjenjuju u kliničkoj i laboratorijskoj praksi. Imunokemijske metode kao indirektna imunofluorescencija (IIF), pasivna aglutinacija (PA), imunodifuzija (ID), imunoprecipitacija (IPA) i imunoblot (IB) daju kvalitativne rezultate, a imunometrijske metode kao radioimunološka (RIA), enzimskoimunokemijska (EIA), fluoroimunokemijska (FIA) i kemiluminescentna imunoanaliza (CLIA) daju kvantitativne rezultate za određeno autoantitijelo. U detekciji antinuklearnih antitijela (ANA), najčešće prvoj pretrazi u dijagnostici autoimunih bolesti, kao metoda probira se koristi IIF na supstratu stanične kulture HEp-2 stanica. IIF je osjetljiva i specifična, ali nedovoljno reproducibilna metoda. EIA za dokazivanje ANA koristi antigene pripremljene iz HEp-2 stanica je automatizirana, reproducibilna i donekle standardizirana. Međutim, u kliničkoj evaluaciji dobro definiranih pacijenata sa sklerodermom analiza ANA HEp-2 EIA testom daje manje pozitivnih rezultata u odnosu na ANA IIF. Za točno određivanje pojedinačnog autoantitijela važno je prepoznavanje kliničkih simptoma i poznavanje biokemijskih karakteristika ciljnog antigena, kako bi se izabrao odgovarajući test. Mnoge studije ukazuju na značajnu analitičku varijabilnost standardiziranih testova različitih proizvođača. Ovakvi rezultati ukazuju na potrebu standardizacije procesa analize te primjenu neovisnog ili internacionalnog standarda.

Nova, multipleks-tehnologija, koja se koristi u detekciji autoantitijela, omogućuje spajanje višestrukih testova i istovremeno mjerenje više analita u jednom uzorku. No, brojni podaci o usporedivosti metode s IIF ili EIA ukazuju na postojanje lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata.

Rezultati različitih laboratorija ili kliničkih studija često nisu usporedivi što slabi značaj medicine temeljene na dokazima (engl. *evidence-based medicine*, EBM).

S01-4

Laboratory diagnosis of autoimmune diseases – new technologies, old dilemmas

Salamunić I

Department of Medical Laboratory Diagnosis, Split University Hospital Center, Split, Croatia

Autoimmune disease occurs when the body's immune system begins to attack its own antigens. A hallmark is the production of high-affinity autoantibodies. The diagnosis of autoimmune diseases depends on the identification of disease-associated clinical symptoms and is associated with the detection of autoantibodies.

Autoimmunity laboratories analyse and measure an increasing number of autoantibodies employing broad spectrum of techniques and methods. Conventional immunoassay methods were first developed in 1957. Since then, several technologies have been developed and used in clinical practice. Immunochemical methods like immunofluorescence (IIF), passive agglutination (PA), immunodiffusion (ID), immunoprecipitation (IPA), immunoblot (IB), have allowed qualitative research defining the presence or absence of autoantibodies in the serum of patients. Immunometric methods like radioimmunoassay (RIA), enzyme immunoassay (EIA), fluoroimmunoassay (FIA), chemiluminescent immunoassay (CLIA), have allowed quantitative measurement of antibody concentrations. A variety of techniques have been used to develop specific tests for antinuclear antibody (ANA). IIF method used of HEp-2 cells as substrate has remained the gold standard for ANA detection. This highly sensitive and specific method has some limitations. The HEp-2 antinuclear antibody EIA (HEp-2 ANA EIA) is automated method with high reproducibility and with internal calibration as a basis for standardisation. But, for example, evaluation of clinically well-defined samples in case of scleroderma patients, HEp-2 ANA EIA yielded a lower rate of positive results compared to ANA IIF. The accurate determination of single antibody specificities requires a perfect understanding of their clinical significance, as well as the biochemical characteristics of the target antigens and selection the most appropriate test systems. Many studies conducted under standardized conditions showed the analytical variability of different test systems. Results of these studies underline the need for a drastic standardization of the procedures used and the importance of independent calibrators or international standards.

Multiplex technologies for the study of autoantibody profiles are the new technologies. The possibility of simultaneous measuring a number of correlated analytes (multiplexing) overcomes some limitations of conventio-

Primjena tehnologija proteomike kao nove mogućnosti možda će izazvati preokret u pristupu i kliničkoj i laboratorijskoj dijagnostici autoimunih bolesti.

Standardizacija u detekciji autoantitijela bilo „starih“ ili „novih“ metoda i tehnologija je neophodna zbog postavljanja ispravnih dijagnoza i liječenja autoimunih bolesti. Zbog toga se mnoge institucije bave problemom standardizacije. Među njima je i Odbor za standardizaciju autoantitijela (engl. *The Autoantibody Standardisation Committee*, ASC) koji je još osamdesetih godina prošloga stoljeća uočio potrebu za referentnim serumom humanoga porijekla u standardizaciji. Prije nekoliko godina osnovana grupa Europske inicijative za standardizaciju u dijagnostici autoimunih bolesti (engl. *The European Autoimmunity Standardisation Initiative*, EASI) ima za cilj potaknuti interakciju laboratorija i kliničke prakse, harmonizirati detekciju autoantitijela te doprinijeti konceptu standardizacije i dijagnostičke strategije u području dijagnostike autoimunih bolesti.

e-pošta: ilza.salamunic@gmail.com

nal methods. However, the data do not correlate well with results obtained from IIF testing or EIA suggesting high rates of both false positive and false negative results. Results obtained in laboratories or in different clinical studies are not interchangeable always, which impairs evidence-based medicine (EBM).

The application of proteomic technologies to the diagnosis of autoimmune disease has opened up new diagnostics possibility which may revolutionize diagnostics procedures in future.

Standardisation of autoantibody assay „old“ or „new“ is critical to their use in the clinic to predict diagnose and treat a very diverse group of autoimmune disorders.

The Autoantibody Standardisation Committee (ASC) was established in the early 1980s based on the recognised needs for reference human autoimmune sera in standardisation. European Autoimmunity Standardisation Initiative (EASI) was formed to discuss how interaction between laboratories and clinics could be improved in practice, how algorithms in autoantibody testing could be harmonized, and what an international concept of standardisation of diagnostic strategies in this area could be look like.

e-mail: ilza.salamunic@gmail.com

S01-5

Nova strategija u dijagnostici monoklonskih gamopatija

Matišić D

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Monoklonske gamopatije (MG) spadaju u skupinu imunoproliferativnih bolesti koje karakterizira prisutnost monoklonskih komponenti u serumu i/ili mokraći koje stvara klon B-stanica podvrgnut genetičkoj transformaciji. Takvo stanje može biti posljedica benigne ili maligne bolesti koja se onda manifestira kliničkim simptomima od asimptomatskoga neprogresivnog stadija do malignog agresivnog multiplog mijeloma ili limfoma.

Laboratorijska dijagnostika MG obuhvaća određivanje ukupnih proteina u serumu, elektroforezu serumskih proteina (SPE), imunoglobulina G, A i M (IgG, IgA, IgM), definiranje razreda i tipa eventualno prisutnoga monoklonskog imunoglobulina (M Ig), beta-2-mikroglobulina, kreatinina i kalcija u serumu, te potvrđivanje monoklonskih slobod-

S01-5

New strategy in diagnosis of monoclonal gammopathies

Matišić D

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of Medicine and Clinical Hospital Center, Zagreb, Croatia

Monoclonal gammopathies (MG) belong to the group of immunoproliferative diseases characterized by the presence of monoclonal components in serum and/or urine that are produced by B-cell clone subjected to genetic transformation. Such condition can be the consequence of benign or malignant disease that manifests in clinical symptoms from asymptomatic nonprogressive stage to malignant aggressive multiple myeloma or lymphoma. Laboratory diagnosis of MG comprises determination of serum total proteins, serum protein electrophoresis (SPE), immunoglobulins G, A and M (IgG, IgA, IgM), definition of the class and type of possibly present monoclonal immunoglobulin (M Ig), beta-2-microglobulin, creatinine and serum calcium, and confirmation of monoclonal free lig-

nih lakih lanaca (BJP) imunofiksacijom (IF) u serumu i 24-satnoj mokraći.

Razvoj reagensa Free Light Chain omogućio je rutinsko kvantitativno određivanje BJP tipa kapa i lambda te povećao kliničku važnost BJP.

Serumska koncentracija BJP korelira samo s aktivnošću koštane srži, što znači da njihov nalaz može biti neovisan biljeg MG. Jedan posebno važan aspekt BJP je njihov kratak poluživot: 2-3 sata za kapu i 5-6 sati za lambda, što je 150 puta kraće vrijeme od 21 dana koliko je, primjerice, poluživot IgG. Tako koncentracija BJP omogućuje vrlo brzu procjenu učinka kemoterapije: 92-128 dana brže nego koncentracija M Ig.

Koncentracija BJP ovisi o stvaranju plazma-stanica, ali isto tako i o bubrežnom klirensu. Uz poliklonsku sintezu imunoglobulina i/ili bubrežnog oštećenja, naći ćemo 10-20 puta povećanu koncentraciju BJP u serumu. Bubrežno izlučivanje BJP raste s koncentracijom u serumu, ali značajno opada kada je visoka koncentracija kombinirana s bubrežnim oštećenjem.

Katzmann JA. i Hill PG. pokazali su na velikom broju bolesnika, u dvije odvojene studije, da zbog oštećenja bubrega u približno 25% bolesnika s MG možemo naći lažno pozitivne nalaze BJP u serumu, odnosno lažno negativne u mokraći.

Odlaganje BJP je izravno odgovorno za patološke procese tubulointersticijskog oštećenja. Nakon filtracije, BJP se vežu na heteromerične receptore koji se sastoje od kubilina i megalina i time injiciraju reapsorpciju u proksimalne tubule. Poslije endocitoze i hidrolize BJP se vraćaju kao aminokiseline u cirkulaciju. BJP su otrovni zbog potencijalnih interakcija sa svim dijelovima nefrona. Nefrotoksični potencijal BJP ovisan je o njihovom fizikalno-kemijskom sastavu kao i utjecaju okoliša u kojem se nalaze.

Skupljanje 24-satne mokraće je mukotrpno za bolesnike i uglavnom netočno. Laboratorijski postupak evaluacije monoklonskog proteina znatno se produljuje zbog obrade 24-satne mokraće. Stoga mnogi kliničari predlažu da se obrada 24-satne mokraće ukloni iz postupnika za definiranje M Ig. Mokraća će se obrađivati diskontinuirano, tj. kod raznih disproteinemija kao i za praćenje bolesti jednom kad je monoklonski protein već identificiran.

Primjenjujući program određivanja ukupnih proteina u serumu, SPE, kvantitativnog određivanja BJP tipa kapa i lambda u serumu kao i njihovog omjera eliminiramo potrebu prikupljanja 24-satne mokraće, što znatno skraćuje proces definiranja monoklonskih komponenti.

e-pošta: dmatisc@kbc-zagreb.hr

ht chains (BJP) by immunofixation (IF) in serum and 24-h urine.

The development of the Free Light Chain reagent enabled routine quantitative determination of kappa and lambda type BJP, and increased the clinical significance of BJP.

Serum BJP concentration correlates only with bone marrow activity, indicating that BJP finding can be an independent marker of MG. A particularly important aspect of BJP is their short half-life: 2-3 hours for kappa and 5-6 hours for lambda, which is a 150-fold shorter period than 21 days that is, e.g., an IgG half-life. Thus, BJP concentration allows very rapid assessment of chemotherapy effects: 92-128 days faster than M Ig concentration.

BJP concentration depends on the production of plasma cells, but also on renal clearance. Polyclonal immunoglobulin synthesis and/or kidney lesion may result in 10-20-fold increased synthesis of serum BJP. Renal BJP excretion increases with BJP serum concentration but significantly drops when the high concentration is combined with kidney lesion. In two separate studies, Katzmann JA. and Hill PG. showed on a high number of patients that false positive results of serum BJP, and false negative in urine, can be found due to kidney lesion (in approximately 25% of MG patients).

BJP accumulation is the direct cause of pathological processes in tubulointerstitial lesion. After filtration, BJP are bound to heteromeric receptors that consist of cubilin and megalin and thus initiate reabsorption into proximal tubules. Following endocytosis and hydrolysis, BJP return as amino acids into circulation. BJP are toxic due to possible interactions with all nephron segments. Nephrotoxic potential of BJP is dependent on their physico-chemical content and on the impact of their environment.

The collection of 24-h urine is cumbersome for patients and mostly incorrect. The laboratory procedure of monoclonal protein evaluation is considerably prolonged due to 24-h urine analysis. This is why many clinicians suggest that 24-h urine should be eliminated from protein M screening. Urine is to be analyzed discontinuously, i.e. in case of various disproteinemias and for monitoring diseases after a monoclonal protein had already been identified.

The application of the program of serum total protein determination, a quantitative determination of kappa and lambda type BJP in serum and of their ratio eliminates the need to collect 24-h urine, which considerably reduces the process of defining monoclonal components.

e-mail: dmatisc@kbc-zagreb.hr

S01-6

Interferencije svojstvene imunokemijskim metodama

Dodig S

Dječja bolnica Srebrnjak, Referentni centar Ministarstva zdravstva za kliničku alergologiju djece, Zagreb

Osnovno svojstvo svih imunokemijskih metoda – od imunoprecipitacijskih do biočip metoda – jest da reagens, kojim se otkriva ili kvantitativno određuje ciljni analit (antigen), sadrži antitijelo. Iako je nekovalentna veza između analita i antitijela specifična, moguće su brojne interferencije, bilo lažno povećane bilo lažno smanjene. Interferencije u imunokemijskim metodama mogu se otkriti: A. u tijeku razvoja/evaluacije metode i B. u svakodnevnom radu. Ove potonje su: 1. križna reaktivnost s endogenim i egzogenim substancijama koje nemaju strukturu antitijela, 2. križna reaktivnost s endogenim i egzogenim substancijama koje imaju strukturu antitijela, 3. prozonski učinak i 4. utjecaj matriksa.

1. Križna reaktivnost s endogenim i egzogenim substancijama koje nemaju strukturu antitijela: Križna je reaktivnost (najčešća interferencija u kompetitivnim metodama) podrazumijeva nespecifičan utjecaj tvari u uzorku koja je strukturalno slična analitu te kompetira za vezno mjesto na antitijelu. Stupanj interferencije ovisi o tri čimbenika: specifičnosti antitijela, obliku testa i pripremi uzorka. Najčešći su primjeri pri određivanju koncentracije hormona, lijekova odnosno alergenspecifičnih IgE.
2. Križna reaktivnost s endogenim i egzogenim substancijama koje imaju strukturu antitijela: Na imunokemijsku reakciju mogu utjecati antitijela prisutna u biološkim uzorcima ili antitijela prisutna u reagensu. Biološki uzorci mogu sadržavati egzogena (primjerice biološki lijekovi) i endogena antitijela (primjerice heterofilna antitijela, tj. prirodna antitijela i autoantitijela te anti-animalna antitijela-HAAs). Endogena antitijela prisutna su u oko 40% bolesnika, osobito onih koji su doživjeli imunoterapiju s monoklonalnim antitijelima.
3. Prozonski učinak: Prozonski učinak (engl. *hook effect*) temelji se na krivulji zasićenja antitijela s antigenom. Primarno prozonski učinak ovisi o koncentraciji analita. Podrazumijeva postojanje njegova izrazitog suviška, koji zasiti sva vezna mjesta na protutijelu, a nastaje uglavnom u metodama kod kojih se sve antigen, antitijelo i biljeg inkubiraju istodobno (engl. *single step assay*). Prozonski učinak ne postoji kod kompetitivnih imunokemijskih analiza.
4. Utjecaj matriksa: Svaka komponenta, kao sastavni dio imunokemijske analize (biološki uzorak, pufer, protuti-

S01-6

Interferences special to immunoassays

Dodig S

Srebrnjak Children's Hospital, Reference Center for Clinical Allergology in Children, Zagreb, Croatia

The main feature of immunoassays - from immunoprecipitation to micro-arrays - is that an antibody used as a reagent, detects an analyte (antigen) of interest. Although the noncovalent bound between analyte and antibody is specific, false-positive and false-negative interferences are possible. Interferences in immunoassays could be detected: A. during development/evaluation of an assay, and B. during routine use. The later are: 1. cross-reactivity with endogenous and exogenous non antibody-structured substances, 2. cross-reactivity with endogenous and exogenous antibody-structure substances 3. the hook effect, and 4. the matrix effect.

1. Cross-reactivity with endogenous and exogenous non antibody-structured substances: Cross-reactivity (the most common interference in competitive immunoassays) implies that non-specific influence of substances occurs in a sample that structurally resembles analyte and competes for binding site on antibody. The interference grade depends on three factors: antibody specificity, test design and sample preparation. Interference most often occurs: during determination of hormone concentration, drugs and allergene-specific IgE, respectively.
2. Cross-reactivity with endogenous and exogenous antibody-structured substances: Immunoreaction can be affected by antibodies present in biological samples of a patient or antibodies from the reagent. Human samples can contain exogenous (i.e. biological drugs) and endogenous antibodies (heterophilic antibodies, i.e. natural antibodies and autoantibodies and anti-animal antibodies, i.e. human anti-animal antibodies-HAAs). Endogenous antibodies could be found in about 40% of patients, especially in those who were subjected to immunotherapy with monoclonal antibodies.
3. Prozone effect: The prozone effect (hook effect) is based on the saturation curve of antibody with antigen. Primarily prozone effect depends on analyte concentration. It implies the presence of huge excess of analyte which saturates all binding sites on antibody, and it occurs mostly in assays where antigen, antibody and marker, respectively, incubate simultaneously (single step assay). The prozone effect does not occur in competitive immunoassays.

jelo, pomoćne tvari), sadržana u imunokemijskoj analizi ima svoj matriks. Sve te komponente, bilo iz biološkog uzorka (lipidi, proteini, ugljikohidrati, sol, voda) ili egzogenih izvora mogu utjecati na ciljni analit čija se koncentracija određuje. Endogene sastavnice uzrokuju interindividualnu i intraindividualnu varijabilnost rezultata. Komponente matriksa imaju mali afinitet vezanja za analit ili antitijelo - obično maskiraju analit ili antitijelo, zbog čega izostaje reakcija vezanja analita s antitijelom.

U budućnosti će se interferencije povećavati u nekim područjima (primjerice kod primjene bioloških lijekova), a u nekim će se područjima smanjivati. Ipak, problemi interferencija u imunokemijskim analizama će biti trajan problem. Stoga stručnjaci laboratorijske medicine, liječnici i stručnjaci koji razvijaju imunokemijske postupke moraju biti svjesni tih problema i smanjivati interferencije na najmanju moguću mjeru.

e-pošta: slavica.dodig@zg.t-com.hr

4. The matrix effect: Each component of immunoassays (biological sample, buffer, antibody, additive) has its own matrix. All of them, whether coming from biological sample (lipids, proteins, carbohydrates, salt, water), or from exogenous sources, can affect the target analyte to be measured. Endogenous elements cause inter- and intra-individual variability of results. Matrix components have low affinity of binding to analyte or antibody - usually disguise the analyte or the antibody causing the absence of the binding reaction of analyte to antibody.

In the future, in some areas (especially associated with implementation of biological drugs) interferences will increase, and in other areas (implementation of high specificity immunoassays) interferences will recede. However, problems of interferences in immunoassays will persist. Therefore, the laboratory medicine experts, the physicians and the experts who develop the immunoassays must be aware of these problems, and to minimize them to a lesser extent.

e-mail: dmatisc@kbc-zagreb.hr

S02 – Farmakogenetika

S02-1

Farmakogenetski pristup u optimiziranju terapije

Plebani M

Zavod za laboratorijsku medicinu, Sveučilišna bolnica u Padovi, Padova, Italija

Farmakogenetika je znanstvena disciplina koja proučava ulogu nasljedstva kod interindividualnih varijacija u odgovoru na lijek. Farmakogenetika pokušava pronaći mogućnost primjene znanja o bolesnikovoj sekvenci DNK u poboljšanju terapije maksimizirajući učinak lijeka, kako bi se lijekovi ciljano davali bolesnicima koji će na njih pozitivno reagirati ili da se izbjegnu neželjene reakcije na lijek. U zadnjih je 10 do 15 godina farmakogenetika privukla pažnju kao disciplina koja bi se mogla primijeniti u bolničkoj skrbi za bolesnika. Dok se u publikacijama još uvijek razrađuje njen klinički utjecaj, znanje potrebno za definiranje i tumačenje istraživanja koja bi procijenilo kliničku korisnost farmakogenetike potaklo je mnoge debate. Primjena farmakogenetike u unapređenju koncepta personalizacije medicine ovisi o sposobnosti kliničkih laboratorija da pruže točne, korisne i pravodobne informacije koje bi kliničarima omogućile propisivanje pravog lijeka (učinkovitost) u pravoj dozi (doziranje), za pravog bolesnika (sigurnosna učinkovitost) i u pravi trenutak.

Citokromi P450 (CYP) su važna skupina enzima u metabolizmu mnogih terapija i endogenih metaboličkih aktiv-

S02 – Pharmacogenetics

S02-1

Pharmacogenetic approach in optimizing therapy

Plebani M

Department of Laboratory Medicine, University Hospital of Padova, Padova, Italy

Pharmacogenetics is the study of the role of inheritance in inter-individual variation in drug response. The ultimate promise of pharmacogenetics is the possibility that knowledge of a patient's DNA sequence might be used to enhance drug therapy to maximize efficacy, to target drugs only to those patients that are likely to respond or to avoid adverse drug reactions. In the past 10 to 15 years pharmacogenetics (PGx) has generated attention as a discipline with potential application to patient care. While the literature is still evolving as to clinical impact, the knowledge needed to define and interpret studies to assess clinical utility has drawn much debate. The application of PGx to enhancing the concept of personalized medicine hinges on the ability of clinical laboratories to provide accurate, timely and useful information, thus enabling the clinicians to administer the right drug (efficacy), at the right dose (dosing), for the right patients (safety efficacy) and at the right time.

In particular, cytochrome P450s (CYPs) are an important family of enzymes in the metabolism of many therapeutic

nosti. Ovo će predavanje dati pregled literature i našeg iskustva u određivanju genotipa alela odabranih CYP gena korištenjem nekoliko tehnologija uključujući i test Roche AmpliChip P450 Array.

Čitav niz sakupljenih dokaza pokazuje važnost genotipiziranja CYP, posebno s obzirom na CYP2D6 i CYP2C19. Genotipizacija CYP2D6 dala je jako zanimljive rezultate kod bolesnika s karcinomom dojke liječenih s tamoksifenom, kao i s proljekovima kao što su analozi kodeina i antiaritmiци. CYP2C i njegov polimorfni izooblik CYP2C19 sudjeluju u metabolizmu nekoliko važnih lijekova kao što su triciklični antidepresivi te inhibitori protonске pumpe omeprazol i lansoprazol. Štoviše, budući da je među svim neželjenim reakcijama na lijekove, terapija varfarinom najčešći uzrok hospitalizacije s medicinskim posljedicama i pratećim troškovima, u ovom ću predavanju dati pregled naših podataka o primjeni farmakogenetičkih informacija u predviđanju doziranja lijeka i uklanjanju poteškoća pri optimiranju antikoagulantne terapije varfarinom.

Prijelaz iz farmakogenetičkih istraživanja u kliničku praksu zahtjeva eksplicitnu analitičku i kliničku procjenu i pomnu analizu ravnoteže dobrobiti i pratećih rizika uključujući i pripadajuće troškove. O ograničenjima korištenja farmakogenetike treba se i dalje raspravljati isto kao i o načinima za nadilaženje tih ograničenja.

e-pošta: mario.plebani@unipd.it

S02-2

Od farmakogenetskog genotipa do predviđanja doze lijeka

Štefanović M

Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Usprkos ubrzanom razvoju farmakogenetike u zadnjih 20-ak godina, svega je nekoliko gena čiji se farmakogenetski polimorfizmi enzima metabolizma lijekova danas rutinski određuju i imaju definiranu kliničku primjenu. Mnoga pitanja priječe put od otkrića novog genetskog polimorfizma do kliničke primjene njegova određivanja. Većinu tih pitanja obuhvaćaju Preporuke za laboratorijsku dijagnostiku i primjenu farmakogenetike u kliničkoj praksi, Američke Nacionalne Akademije za Kliničku Biokemiju – NACB, u svojoj trećoj radnoj verziji iz 2007. godine. Predavanje donosi njihov kratak pregled.

Problemi u farmakogenetskom testiranju. Brojni su primjeri specifičnih problema u farmakogenetici. Zbog velikih razlika u frekvenciji alela između pojedinih etničkih

tic agents and endogenous metabolic activities. This presentation will provide a review of the literature and of our personal experience in determining genotypes of alleles of selected CYP genes by using several technologies, including the Roche AmpliChip P450 Array.

A body of evidence demonstrates the importance of CYP genotyping, particularly regarding CYP2D6 and CYP2C19. CYP2D6 genotyping resulted to be very interesting in tamoxifen treated breast-cancer patients, as well as for prodrugs such as codeine opiates and antiarrhythmics. CYP2C and its polymorphic isoform CYP2C19 is involved in metabolism of several important drugs including most tricyclic antidepressants, and the proton pump inhibitors omeprazole and lansoprazole. Moreover, being the Warfarin therapy a leading cause of hospitalization among adverse drug reactions, with medical consequences and costs, I will review our data on the application of pharmacogenetic information to predict dosing amounts and to eliminate what has been termed “oversteer” in using warfarin for anticoagulation therapy.

Translation of pharmacogenetic research into clinical practice requires explicit analytical and clinical evaluation, and a careful analysis of the balance of benefits and associated risks, including costs. The barriers to using PGx will be discussed as well as the ways to overcome these barriers.

e-mail: mario.plebani@unipd.it

S02-2

From pharmacogenetic genotype to drug dose prediction

Štefanović M

University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Despite quick development of pharmacogenetics in the latest 20 years, there are only few genes with pharmacogenetic polymorphisms that are routinely determined, and their clinical usage is clearly defined. Many questions affect the process that start with a new genetic polymorphism discovery and ends with a clinical usage of its determination. Most of these questions are gathered in Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis and Application of Pharmacogenetics to Clinical Practice (2007, 3rd draft) issued by National Academy of Clinical Biochemistry (NACB). This lecture brings a short overview of those guidelines.

Problems in Pharmacogenetic testing. There are many examples of specific problems in pharmacogenetics. Because of great differences in allele frequencies among

jelo, pomoćne tvari), sadržana u imunokemijskoj analizi ima svoj matriks. Sve te komponente, bilo iz biološkog uzorka (lipidi, proteini, ugljikohidrati, sol, voda) ili egzogenih izvora mogu utjecati na ciljni analit čija se koncentracija određuje. Endogene sastavnice uzrokuju interindividualnu i intraindividualnu varijabilnost rezultata. Komponente matriksa imaju mali afinitet vezanja za analit ili antitijelo - obično maskiraju analit ili antitijelo, zbog čega izostaje reakcija vezanja analita s antitijelom.

U budućnosti će se interferencije povećavati u nekim područjima (primjerice kod primjene bioloških lijekova), a u nekim će se područjima smanjivati. Ipak, problemi interferencija u imunokemijskim analizama će biti trajan problem. Stoga stručnjaci laboratorijske medicine, liječnici i stručnjaci koji razvijaju imunokemijske postupke moraju biti svjesni tih problema i smanjivati interferencije na najmanju moguću mjeru.

e-pošta: slavica.dodig@zg.t-com.hr

4. The matrix effect: Each component of immunoassays (biological sample, buffer, antibody, additive) has its own matrix. All of them, whether coming from biological sample (lipids, proteins, carbohydrates, salt, water), or from exogenous sources, can affect the target analyte to be measured. Endogenous elements cause inter- and intra-individual variability of results. Matrix components have low affinity of binding to analyte or antibody - usually disguise the analyte or the antibody causing the absence of the binding reaction of analyte to antibody.

In the future, in some areas (especially associated with implementation of biological drugs) interferences will increase, and in other areas (implementation of high specificity immunoassays) interferences will recede. However, problems of interferences in immunoassays will persist. Therefore, the laboratory medicine experts, the physicians and the experts who develop the immunoassays must be aware of these problems, and to minimize them to a lesser extent.

e-mail: dmatisc@kbc-zagreb.hr

S02 – Farmakogenetika

S02-1

Farmakogenetski pristup u optimiziranju terapije

Plebani M

Zavod za laboratorijsku medicinu, Sveučilišna bolnica u Padovi, Padova, Italija

Farmakogenetika je znanstvena disciplina koja proučava ulogu nasljedstva kod interindividualnih varijacija u odgovoru na lijek. Farmakogenetika pokušava pronaći mogućnost primjene znanja o bolesnikovoj sekvenci DNK u poboljšanju terapije maksimizirajući učinak lijeka, kako bi se lijekovi ciljano davali bolesnicima koji će na njih pozitivno reagirati ili da se izbjegnu neželjene reakcije na lijek. U zadnjih je 10 do 15 godina farmakogenetika privukla pažnju kao disciplina koja bi se mogla primijeniti u bolničkoj skrbi za bolesnika. Dok se u publikacijama još uvijek razrađuje njen klinički utjecaj, znanje potrebno za definiranje i tumačenje istraživanja koja bi procijenilo kliničku korisnost farmakogenetike potaklo je mnoge debate. Primjena farmakogenetike u unapređenju koncepta personalizacije medicine ovisi o sposobnosti kliničkih laboratorija da pruže točne, korisne i pravodobne informacije koje bi kliničarima omogućile propisivanje pravog lijeka (učinkovitost) u pravoj dozi (doziranje), za pravog bolesnika (sigurnosna učinkovitost) i u pravi trenutak.

Citokromi P450 (CYP) su važna skupina enzima u metabolizmu mnogih terapija i endogenih metaboličkih aktiv-

S02 – Pharmacogenetics

S02-1

Pharmacogenetic approach in optimizing therapy

Plebani M

Department of Laboratory Medicine, University Hospital of Padova, Padova, Italy

Pharmacogenetics is the study of the role of inheritance in inter-individual variation in drug response. The ultimate promise of pharmacogenetics is the possibility that knowledge of a patient's DNA sequence might be used to enhance drug therapy to maximize efficacy, to target drugs only to those patients that are likely to respond or to avoid adverse drug reactions. In the past 10 to 15 years pharmacogenetics (PGx) has generated attention as a discipline with potential application to patient care. While the literature is still evolving as to clinical impact, the knowledge needed to define and interpret studies to assess clinical utility has drawn much debate. The application of PGx to enhancing the concept of personalized medicine hinges on the ability of clinical laboratories to provide accurate, timely and useful information, thus enabling the clinicians to administer the right drug (efficacy), at the right dose (dosing), for the right patients (safety efficacy) and at the right time.

In particular, cytochrome P450s (CYPs) are an important family of enzymes in the metabolism of many therapeutic

nosti. Ovo će predavanje dati pregled literature i našeg iskustva u određivanju genotipa alela odabranih CYP gena korištenjem nekoliko tehnologija uključujući i test Roche AmpliChip P450 Array.

Čitav niz sakupljenih dokaza pokazuje važnost genotipiziranja CYP, posebno s obzirom na CYP2D6 i CYP2C19. Genotipizacija CYP2D6 dala je jako zanimljive rezultate kod bolesnika s karcinomom dojke liječenih s tamoksifenom, kao i s proljekovima kao što su analozi kodeina i antiaritmiци. CYP2C i njegov polimorfni izooblik CYP2C19 sudjeluju u metabolizmu nekoliko važnih lijekova kao što su triciklični antidepressivi te inhibitori protonске pumpe omeprazol i lansoprazol. Štoviše, budući da je među svim neželjenim reakcijama na lijekove, terapija varfarinom najčešći uzrok hospitalizacije s medicinskim posljedicama i pratećim troškovima, u ovom ću predavanju dati pregled naših podataka o primjeni farmakogenetičkih informacija u predviđanju doziranja lijeka i uklanjanju poteškoća pri optimiranju antikoagulantne terapije varfarinom.

Prijelaz iz farmakogenetičkih istraživanja u kliničku praksu zahtjeva eksplicitnu analitičku i kliničku procjenu i pomnu analizu ravnoteže dobrobiti i pratećih rizika uključujući i pripadajuće troškove. O ograničenjima korištenja farmakogenetike treba se i dalje raspravljati isto kao i o načinima za nadilaženje tih ograničenja.

e-pošta: mario.plebani@unipd.it

S02-2

Od farmakogenetskog genotipa do predviđanja doze lijeka

Štefanović M

Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Usprkos ubrzanom razvoju farmakogenetike u zadnjih 20-ak godina, svega je nekoliko gena čiji se farmakogenetski polimorfizmi enzima metabolizma lijekova danas rutinski određuju i imaju definiranu kliničku primjenu. Mnoga pitanja priječe put od otkrića novog genetskog polimorfizma do kliničke primjene njegova određivanja. Većinu tih pitanja obuhvaćaju Preporuke za laboratorijsku dijagnostiku i primjenu farmakogenetike u kliničkoj praksi, Američke Nacionalne Akademije za Kliničku Biokemiju – NACB, u svojoj trećoj radnoj verziji iz 2007. godine. Predavanje donosi njihov kratak pregled.

Problemi u farmakogenetskom testiranju. Brojni su primjeri specifičnih problema u farmakogenetici. Zbog velikih razlika u frekvenciji alela između pojedinih etničkih

tic agents and endogenous metabolic activities. This presentation will provide a review of the literature and of our personal experience in determining genotypes of alleles of selected CYP genes by using several technologies, including the Roche AmpliChip P450 Array.

A body of evidence demonstrates the importance of CYP genotyping, particularly regarding CYP2D6 and CYP2C19. CYP2D6 genotyping resulted to be very interesting in tamoxifen treated breast-cancer patients, as well as for prodrugs such as codeine opiates and antiarrhythmics. CYP2C and its polymorphic isoform CYP2C19 is involved in metabolism of several important drugs including most tricyclic antidepressants, and the proton pump inhibitors omeprazole and lansoprazole. Moreover, being the Warfarin therapy a leading cause of hospitalization among adverse drug reactions, with medical consequences and costs, I will review our data on the application of pharmacogenetic information to predict dosing amounts and to eliminate what has been termed “oversteer” in using warfarin for anticoagulation therapy.

Translation of pharmacogenetic research into clinical practice requires explicit analytical and clinical evaluation, and a careful analysis of the balance of benefits and associated risks, including costs. The barriers to using PGx will be discussed as well as the ways to overcome these barriers.

e-mail: mario.plebani@unipd.it

S02-2

From pharmacogenetic genotype to drug dose prediction

Štefanović M

University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Despite quick development of pharmacogenetics in the latest 20 years, there are only few genes with pharmacogenetic polymorphisms that are routinely determined, and their clinical usage is clearly defined. Many questions affect the process that start with a new genetic polymorphism discovery and ends with a clinical usage of its determination. Most of these questions are gathered in Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis and Application of Pharmacogenetics to Clinical Practice (2007, 3rd draft) issued by National Academy of Clinical Biochemistry (NACB). This lecture brings a short overview of those guidelines.

Problems in Pharmacogenetic testing. There are many examples of specific problems in pharmacogenetics. Because of great differences in allele frequencies among

skupina, svaki bi laboratorij za sebe trebao testirati njihove frekvencije, te pratiti statistiku trenda. Neke metode (primjerice sekvenciranje) nisu u mogućnosti utvrditi genske promjene poput velikih genomskih insercija ili delecija. Kontrolni DNA materijal trebao bi biti iz obnovljivog, nezavisnog izvora, a pri određivanju bi se trebalo voditi računa o inhibitorima ili interferencijama, koje mogu dovesti do krive interpretacije rezultata testiranja u odnosu na kliničku sliku.

Laboratorijski nalazi. Preporuka je kako bi rezultati laboratorijskih nalaza trebali jednoznačno predstavljati potvrđenu genetsku strukturu i navoditi samo dokazane karakteristike gena, kako se liječnika ne bi dovodilo u zabunu. Izravno prevođenje genotipa u fenotip može biti opasno, jer fenotipska klasifikacija ne ovisi samo o genotipu, već i o ispitivanom lijeku/supstratu. Laboratorijski nalazi, trebali bi liječniku razjasniti kompleksnu sliku zahvaćenih metaboličkih puteva i testiranih enzima, evaluirati rizik prema interakcijama i analizirati sadašnji i prošli režim terapije. Alternativno, nalaz bi barem trebao navoditi upozoravajuće primjere interakcija. Laboratorij bi trebao pružati i mogućnost interpretacije nalaza, ali ne preporuča se da laboratorij predviđa i dozu lijeka. Metodologija i ograničenja farmakogenetskog testiranja bi uz analitičku osjetljivost/specifičnost testa trebala biti jasno naznačena na nalazu.

Izbor polimorfizama za testiranje. Polimorfizmi obuhvaćeni testiranjem trebali bi imati definirani klinički utjecaj na funkciju, farmakokinetiku, farmakodinamiku i/ili toksičnost lijeka, no još uvijek nema suglasja o svim kriterijima koje bi taj izbor trebao obuhvatiti.

Ekonomska računica. Sa gledišta financijske isplativosti farmakogenetskog testiranja, preporuka ide u prilog razvoja onih testova koji dovode do ublažavanja posljedica nuspojava, poboljšavaju učinkovitost terapije, ili u konačnici smanjuju cjelokupnu cijenu liječenja. Šire probiranje populacije zasad se ne preporuča.

Primijenjeni modeli. Nekoliko je svijetlih primjera kliničke primjene farmakogenetike. Određivanje enzima CYP2C9 i K-vitamin ovisne reduktaze (VKORC) predstavlja pristup uspješnog procjenjivanja doze u antikoagulantnoj terapiji varfarinom, proizašao iz istraživanja multivarijantnim regresijskim modelima. Sljedeći je primjer određivanje tiopurin metil transferaze (TPMT) u strategiji doziranja onkoloških bolesnika na terapiji azatioprinom. Farmakogenotipizacijski algoritmi enzima CYP2D6 uspješno se primjenjuju i u terapiji nekih psihijatrijskih poremećaja - atomoksetinom, te u endokrinom terapiji karcinoma dojke - tamoksifenom. Testiranjem enzima UGT1A1, prevenira se pak toksičnost irinotekana u onkologiji.

U zaključku, praćenje terapije komplementarno je farmakogenetskom testiranju i omogućuje izbor lijeka i doze za one lijekove kod kojih je jasna korelacija između genotipa i doziranja.

e-pošta: mstefan6@gmail.com

individual ethnic groups, every laboratory should perform polymorphism frequencies testing on its own, as well as it should follow their trend statistics. Some methods (e.g. sequencing) are not capable of determining genetic changes like big genomic insertions or deletions. Control material should be derived from the renewable independent source, and while performing the analysis, it should take into account inhibitors or interferences which could lead to misinterpretation of the testing results, when compared to the clinical presentation.

Laboratory results. Recommendation is that laboratory results should unambiguously resemble genetic structure and quote only genetic characteristics that were confirmed, in order not to mislead the physician. Direct "genotype to phenotype" prediction could be dangerous, because phenotype classification does not depend on genotype only, but also on researched drug/substrate. Laboratory results should clarify the clinician a complex picture of metabolic pathways and enzymes affected, evaluate the risk to interactions and analyze the current and previous mode of therapy. Alternatively, the laboratory results should at least cite warning interaction examples. Laboratory should also provide the possibility of interpretation of the findings, but is not recommended for the laboratory to predict drug dose. Methodology and limitations of pharmacogenetic testing should be clearly indicated on the findings, along with the analytical sensitivity/specificity.

Selection for polymorphism test. Polymorphisms included in testing should have their clinically impact on function, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and/or drug toxicity defined, but there is still no consensus on all the criteria that this choice should include.

Economic calculation. Concerning the financial viability of pharmacogenetic testing, recommendation is in favor of developing tests that lead to the mitigation of side effects, improving the effectiveness of therapy, or ultimately reduce the overall cost of treatment. Wider population screening is not recommended.

Applying the models. There are several examples of clinical applications of pharmacogenetic testing. Determination of enzymes CYP2C9 and vitamin K-dependent reductase (VKORC) is a successful approach derived from multivariate regression models, in estimating the dose in warfarin anticoagulant therapy. The next example is determining thiopurine methyltransferase (TPMT) in the dosing strategy of oncology patients on azathiopurin therapy. Pharmacogenetic algorithms of CYP2D6 enzyme are successfully applied in the treatment of certain psychiatric disorders with atomoxetine and the treatment of breast cancer with tamoxifen. Testing UGT1A1 enzyme prevents irinotecan toxicity in oncology.

In conclusion, therapy drug monitoring is complementary with pharmacogenetic testing and it enables selection of drug and dose for those medicines with clear correlation between genotype and dosing.

e-mail: mstefan6@gmail.com

S02-3

Farmakogenetika kumarinskih antikoagulanata

Božina N¹, Makar-Aušperger K²

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

²Interna klinika, Zavod za kliničku farmakologiju, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: Doziranje kumarinskih antikoagulanata predstavlja veliki izazov zbog njihova uskoga terapijskog raspona i značajne varijabilnosti u odnosu doze i učinka lijeka. Ta se varijabilnost djelomično može objasniti polimorfizmom gena CYP2C9 koji kodira glavni metabolički enzim kumarinskih lijekova, te polimorfizmom vitamina K-epoksid-reduktaze (VKOR) čija je uloga redukcija vitamina-K-2,3-epoksida u biološki aktivan vitamin K hidrokinon. Učinak kumarinskih lijekova temelji se na inhibiciji aktivnosti VKOR, a ciljno mjesto djelovanja je protein vitamin-K-reduktaza-kompleks, podjedinica 1 (VKORC1) kodiran istoimenim genom VKORC1. Nosioci kombinacije polimorfizama CYP2C9 i VKORC1 imaju povećani rizik izraženog antikoagulacijskog učinka u usporedbi s osobama koje nisu nosioci polimorfizama ili imaju samo jedan polimorfizam. Bolesnici s varijantnim alelom zahtijevaju značajno niže doze u odnosu na VKORC1-wt (divlji tip). Predloženo je nekoliko postupnika doziranja temeljenih na farmakogenetici navedenih enzima, međutim niti jedan još uvijek nema široku primjenu.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti učestalost genotipova CYP2C9 (CYP2C9*2 i CYP2C9*3) i VKORC1 C1173T, te procijeniti odnos između genskih varijanata CYP2C9 i VKORC1 i primijenjene doze varfarina.

Bolesnici i metode: Bolesnicima s indikacijom primjene varfarina hospitaliziranim na Klinici za unutarnje bolesti Kliničkoga bolničkog centra Zagreb (N = 157) provedena je genotipizacija CYP2C9 i VKORC1. Propisana doza varfarina retrospektivno je povezana s alelnim varijantama enzima. Drugi lijekovi, dob, spol, visina i težina također su bili uzeti u obzir u prilagodbi doze. Genotipizacija CYP2C9 (aleli *2 i *3) je provedena metodom PCR u stvarnom vremenu pomoću TIB MOLBIOL LightMix na instrumentu Roche LightCycler. Genotipizacija VKORC1 C1173T je provedena metodom PCR u stvarnom vremenu i PCR-RFLP.

Rezultati: Udio sporih, intermedijarnih i brzih metabolizatora iznosio je 6%, 61% i 33% s obzirom na CYP2C9 i 13%, 49% i 38% za varijante VKORC1. Rezultati su pokazali da oko 76% ispitivanih bolesnika na terapiji varfarinom ima barem jedan „osjetljivi“ (CYP2C9*2,*3, VKORC1 1173T) alel i zahtijeva prilagodbu doze. Doziranje varfarina pokazalo

S02-3

Pharmacogenetics of coumarin anticoagulants

Božina N¹, Makar-Aušperger K²

¹Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of Medicine and Clinical Hospital Center, Zagreb, Croatia

²Department of Internal Medicine, Division of Clinical Pharmacology, Zagreb University Hospital, Zagreb, Croatia

Introduction: Dosing of the coumarin type anticoagulants presents a challenging task due to their narrow therapeutic range and a large variability in dose-response relationship. This variability can partly be explained by polymorphisms of the CYP2C9 gene which encodes the main metabolizing enzyme of coumarins, and by polymorphisms of vitamin K epoxide reductase (VKOR). Coumarins act by inhibiting VKOR activity, their target having been identified as the protein vitamin K reductase complex subunit 1 (VKORC1) which is encoded by the homonymous gene VKORC1. Carriers of a combination of CYP2C9 polymorphism and VKORC1 polymorphism had an increased risk of severe overanticoagulation compared to subjects with no polymorphism or only one polymorphism. Patients with VKORC1 polymorphism required significantly lower doses than VKORC1 wild-type patients. Empirical dose tables based on pharmacogenetics of these enzymes have been proposed, but none of them has yet been widely accepted. The aim of this study was to assess the frequencies of CYP2C9 (CYP2C9*2 and CYP2C9*3 alleles) and the VKORC1 C1173T genotype and to determine the relationship between genetic variations of CYP2C9 and VKORC1 and warfarin dose.

Patients and methods: Patients with an indication for warfarin hospitalized at the Department of Internal Medicine, University Hospital Center Zagreb (N = 157) were genotyped for CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms. Prescribed dose on discharge was retrospectively linked to the enzyme variants. Concomitant medications and age were also taken into account when adjusting the required warfarin dose. The genotyping of CYP2C9 (alleles *2 and *3) was performed by Real time PCR method, using TIB MOLBIOL LightMix in Roche LightCycler instrument. The genotyping of VKORC1 C1173T was performed by Real time PCR method in LightCycler Fast Start DNA Master plus HybProbe master mix, and by PCR-RFLP method.

Results: Slow, intermediate and fast metabolizers accounted for 6%, 61% and 33% regarding CYP2C9, and for 13%, 49% and 38 % regarding VKORC1 variants, res-

je značajnu korelaciju s alelnim varijantama VKORC1 ($P < 0,001$) i CYP2C9 ($P = 0,04$). Bolesnici s visokom aktivnosti VKORC1 i/ili CYP2C9 trebali su statistički značajno više doze varfarina ($6,5 \pm 1,38$ mg) u odnosu na bolesnike s intermedijarnom ($2,48 \pm 1,62$ mg; $P < 0,001$) i niskom aktivnosti VKORC1 i CYP2C9 ($0,87 \pm 0,88$ mg; $P = 0,03$).

Zaključak: Polimorfne varijante VKORC1 i CYP2C9 imaju značajan utjecaj na doziranje varfarina i mogu poslužiti kliničarima kao objektivan parametar u procjeni odgovora na kumarinske antikoagulate.

e-pošta: nbozina@kbc-zagreb.hr

pectively. Our findings show that ~76% of hospitalized patients on warfarin treatment have at least one "sensitive" (CYP2C9*2,*3, VKORC1 1173T) allele. Warfarin dosage on discharge showed correlation with VKORC1 ($P < 0.001$) and CYP2C9 allele variants ($P = 0.041$). Patients with VKORC1 and/or CYP2C9 high activity alleles required statistically higher warfarin doses (6.5 ± 1.38 mg) compared to patients with intermediate (2.48 ± 1.62 mg; $P < 0.001$) and low activity alleles (0.87 ± 0.88 mg; $P < 0.03$).

Conclusion: VKORC1 and CYP2C9 variants have significant influence on the definition of warfarin dose and could serve clinicians as important genetic markers for coumarin type drug response.

e-mail: nbozina@kbc-zagreb.hr

S02-4

Uloga polimorfizama receptora sulfonilureje (SUR-1) u regulaciji šećerne bolesti tipa 2

Nikolac N

Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Šećerna je bolest tipa 2 postala jedan od vodećih javnozdravstvenih problema, kako u svijetu, tako i u Hrvatskoj. Terapijski pristup u prvoj fazi uključuje samo prilagodbu načina života. Ukoliko se na taj način ne postigne odgovarajuća regulacija, prelazi se na terapiju oralnim lijekovima za regulaciju hiperglikemije (OHL), a potom i na inzulin.

Preparati sulfonilureje su OHL koji se već dugo upotrebljavaju u liječenju šećerne bolesti. Mehanizam djelovanja derivata sulfonilureje uključuje poticanje izlučivanja inzulina iz beta-Langerhansovih otočića gušterače. Derivati sulfonilureje vežu se za receptor sulfonilureje (SUR-1) koji je funkcionalna jedinica ATP-ovisnog kalijevog kanala (KATP). Druga komponenta kanala je Kir6.2, unutrašnji ionski kanal koji oblikuje membransku poru. Vezanje sulfonilureje na receptor uzrokuje zatvaranje kalijevog kanala, otvaranje kalcijevog kanala ovisnog o naponu, porast unutarstanične koncentracije kalcija i stimulaciju otpuštanja inzulina iz sekretornih granula egzocitozom. Zatvaranje kalijevog kanala nije potaknuto samo sulfonilurejama, već i stvaranjem ATP-a u metabolizmu glukoze, što ukazuje na značajnu ulogu SUR-1 i Kir6.2 gena, ne samo kod terapije derivatima sulfonilureje, već i kod dijabetičara općenito.

U terapiji šećerne bolesti vrlo je česta kombinirana terapija korištenjem više različitih vrsta lijekova. Naime, iako

S02-4

Sulfonylurea receptor-1 (SUR-1) polymorphisms in regulation of type 2 diabetes

Nikolac N

University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Type 2 diabetes has become one of the leading health issues worldwide. In the beginning, therapeutic approach includes only lifestyle modifications. If this approach doesn't yield desired metabolic control, oral hypoglycaemic agents are introduced and sometimes even insulin therapy is required.

Sulfonylureas are hypoglycaemic agents used for diabetes treatment since the 1950's. Mechanism of action includes increased insulin release from beta cells in pancreas. They bind to sulfonylurea receptor-1 (SUR-1), which is a functional subunit of the ATP-sensitive potassium channel (KATP) located in pancreatic beta cells in islets of Langerhans. The other component of potassium channel is Kir6.2, inwardly rectifying ion channel forming a pore, encoded by gene KCNJ11. Sulfonylureas bind to SUR-1 subunit of potassium channel causing its closure, opening of voltage-gated Ca^{2+} channels, increase of intracellular Ca^{2+} concentration and stimulation of insulin release from secretory granules by exocytosis. Closure of KATP is not initiated only by sulfonylurea action, but also by ATP production in glucose metabolism, indicated significant role of SUR-1 and Kir6.2, not only in diabetics on sulfonylurea therapy, but in diabetes in general.

In therapy of type 2 diabetes, combined approach is very common. In most of the patients sulfonylurea thera-

kod većine bolesnika standardna terapija preparatima sulfonilureje postiže očekivane rezultate u regulaciji šećerne bolesti, kod jednog je dijela bolesnika taj učinak znatno ograničen. U tom se slučaju prvo pristupa kombiniranoj terapiji s nekoliko OHL-a, kombinaciji OHL-a i inzulina te naposljetku terapiji samo inzulinom. Prema rezultatima velikog prospektivnog istraživanja UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) koje je trajalo 20 godina, svake godine 5-7% dijabetičara liječenih sulfonilurejom prelazi na inzulinsku terapiju uslijed neuspjeha liječenja.

Geni koji kodiraju sintezu SUR-1 i Kir6.2 proteina smješteni su na lokusu 11p15.1. Gen za SUR-1 (*ABCC8*, engl. *ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8*) sastoji se od 39 eksona i proteže se oko 100 kpb u duljinu. Kir6.2 gen (*KCNJ11*, engl. *potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11*) se sastoji od samo jednog eksona.

Polimorfizmi ovih gena dovode do povećane vjerojatnosti otvaranja kalijevog kanala, smanjene osjetljivosti kanala na inhibitorno djelovanje ATP-a i povećane granične vrijednosti za otpuštanje inzulina. Ovi mehanizmi mogu dovesti do promijenjenog odgovora na terapiju sulfonilurejom te do lošije kontrole šećerne bolesti, što se može kvantificirati mjerenjem biokemijskih i antropometrijskih pokazatelja koji su u korelaciji sa stupnjem regulacije.

U ovom će izlaganju biti prikazani dosadašnji rezultati proučavanja povezanosti SUR-1 i KCNJ11 polimorfizama sa fenotipovima povezanim sa šećernom bolesti tipa 2 kod bolesnika na terapiji sulfonilurejom.

e-pošta: nora.nikolac@gmail.com

py accomplishes desired metabolic control, however in a number of patients that effect is very limited. In that case, sulfonilurea is combined with insulin, and in more severe cases only insulin therapy is indicated. According to the results of large 20-years prospective study (UK Prospective Diabetes Study - UKPDS), each year there is a failure of sulfonilurea therapy and introduction of insulin in 5-7% of type 2 diabetics.

The genes encoding SUR-1 and Kir6.2 are located on the chromosome 11p15.1. Gene for the SUR-1 (*ABCC8*, ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8) consists of 39 exons, and spans 100 kbp in length. Gene for the other subunit Kir6.2 (*KCNJ11*, potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11) consists of only one exon.

Polymorphisms of these genes can lead to increased probability of opening of potassium channel, decreased sensitivity on ATP inhibition and increased cut-off for insulin release. These mechanisms can lead to modulated response to sulfonilurea therapy and poor metabolic control of type 2 diabetes. This can be quantified by measuring biochemical and anthropometric parameters that are in correlation with degree of metabolic control.

This lecture will present results of our research on association of SUR-1 and KCNJ11 polymorphisms with diabetes associated phenotypes in patients on sulfonilurea therapy.

e-mail: nora.nikolac@gmail.com

S02-5

Utjecaj farmakogenetičkih varijacija na koncentracije antiepileptika u serumu

Lovrić M¹, Božina N¹, Sporiš D², Hajnšek S²

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

²Klinika za neurologiju, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: Danas se u liječenju epilepsije koristi velik broj antiepileptika. Zbog značajnih interindividualnih razlika u koncentracijama i učinkovitosti lijeka, terapijsko praćenje je često i nužno. Uz kliničke i vanjske čimbenike, genetičke se predispozicije također drže važnima u individualizaciji terapije i zauzimaju istaknuto mjesto u stvaranju algoritama za odabir najprikladnijeg lijeka i doze za svakog pojedinog bolesnika. Među farmakogenetičkim biljezima

S02-5

Impact of pharmacogenetic variations on antiepileptic serum level

Lovrić M¹, Božina N¹, Sporiš D², Hajnšek S²

¹Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of Medicine and Clinical Hospital Center, Zagreb, Croatia

²Department of Neurology, Zagreb University Hospital, Zagreb, Croatia

Introduction: A large number of antiepileptics is used today to treat epilepsy. Therapeutic monitoring of this disorder is frequent and necessary due to considerable interindividual differences in drug concentrations and efficacy. Along with clinical and exogenous factors, genetic predispositions have been recognized as an important factor in therapy individualization and they take a promi-

polimorfni transportni proteini, odgovorni za prijenos lijekova preko različitih barijera, nametnuli su se kao važni čimbenici varijabilnosti i bioraspoloživosti različitih antiepileptika. Transportni proteini koji imaju značajnu ulogu u farmakokinetici nalaze se u epitelnim membranama probavnog sustava, bubrega i jetre. Pokazalo se da ABC-transporteri koji kodiraju transportne proteine P-glikoprotein (ABCB1) i protein multirezistencije 2 (ABCC2) utječu na koncentracije lijekova - supstrata.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj polimorfnih varijanti gena ABCB1 (C3435T, C1236T, G2677T/A) i ABCC2 (C24T, G1249A) na koncentracije antiepileptika u serumu. Ispitana je ovisnost koncentracija lamotrigina u plazmi bolesnika na mono- i politerapiji (karbamazepin, okskarbazepin, levetiracetam, fenitoin, fenobarbiton, topiramat, valproat) i navedenih genskih varijanti. Kao kovarijante u statističkoj obradi uključeni su dob, spol, visina, težina, jetreni i bubrežni biokemijski parametri.

Bolesnici i metode: 122 bolesnika s epilepsijom, u dobi od 18-70 godina, podijeljeni su u skupine prema terapiji: monoterapija lamotriginom (N = 25), lamotrigin i lijekovi induktori (N = 60), lamotrigin i inhibitori (N = 19) i skupina koja uz lamotrigin uzima i induktor i inhibitor (N = 18). Genotipizacija ABCB1 provedena je metodama PCR u stvarnom vremenu i PCR-RFLP, a ABCC2 metodom PCR-RFLP. Terapijsko određivanje koncentracije antiepileptika provedeno je metodom HPLC s diode array detektorom i imunokemijskim metodama.

Rezultati: Dokazana je statistički značajna korelacija koncentracije lamotrigina u ovisnosti o: dodatnim lijekovima ($P < 0,001$), ALT, dobi i težini ($P < 0,01$). Statistička analiza pokazala je graničnu korelaciju između koncentracije lamotrigina i varijante C24T gena ABCC2 ($P = 0,074$; CC+CT: TT, 12,2: 22,8 $\mu\text{mol/L}$). Za genotip 1249GG i 1249AA gena ABCC2 srednje vrijednosti koncentracija lamotrigina iznosile su 11,6 i 18,9 $\mu\text{mol/L}$. Analiza genotipa ABCB1 također ukazuje na tendenciju korelacije polimorfizma C1236T s koncentracijom lamotrigina (CC: TT, 14,8: 11,1 $\mu\text{mol/L}$) i polimorfizma C3435T (CC: TT, 13,3: 10,4 $\mu\text{mol/L}$); niska učestalost genotipa TT je ograničavajući čimbenik za statističku analizu.

Zaključak: Preliminarni rezultati ukazuju da polimorfizmi ABCB1 i ABCC2 mogu utjecati na biodostupnost antiepileptika i mogu se ubrojiti u interindividualne farmakokinetičke varijabilnosti. Zbog proturječnih rezultata u literaturi i još nejasne uloge transportnih proteina ABC u farmakokinetici antiepileptika držimo da je potrebno daljnje istraživanje na većem broju ispitanika u svrhu uključivanja ovih farmakogenetičkih pokazatelja za algoritme doziranja antiepileptičkih lijekova.

e-pošta: lovricm@kbc-zagreb.hr

nent place in developing algorithms for selection of the most appropriate drug and dose for each patient. Among pharmacogenetic markers, polymorphic transport proteins, which are responsible for drug transport across various barriers, offered themselves as significant factors of variability and bioavailability of different antiepileptics. Transporter proteins that play important role in pharmacokinetics are located in intestinal, renal and hepatic epithelial membranes. ABC transporters such as P-glycoprotein (ABCB1) and multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) affect bioavailability of their substrate drugs.

Aims of the study were to evaluate the impact of polymorphisms in the ABCB1 (C3435T, C1236T, G2677T/A) and ABCC2 (C24T, G1249A) on antiepileptic drug disposition. We therefore correlated plasma levels of lamotrigine in mono- and polytherapy (carbamazepine, oxcarbazepine, levetiracetam, phenytoin, phenobarbiton, topiramate, valproate) with gene variants. As covariates, age, gender, height, weight, liver and renal biochemical parameters were included.

Patients and methods: 122 epileptic patients, from 18-70 years old, were stratified into lamotrigine monotherapy group (N = 25), a group receiving lamotrigine plus inducers (N = 60), inhibitors (N = 19) or both (N = 18). ABCB1 genotyping (C1236T, C3435T, G2677T/A) was performed by Real-time PCR and PCR-RFLP; ABCC2 (G1249A, C24T) by PCR-RFLP methods. Therapeutic drug monitoring was performed by HPLC with diode array detector and immunoassay.

Results: We found significant differences in lamotrigine concentrations depending on: add-on therapy ($P < 0,001$); ALT, age and weight ($P < 0,01$). Statistical analysis showed borderline correlation between lamotrigine concentrations and C24T variant ABCC2 gene ($P = 0,074$; CC+CT: TT, 12,2: 22,8 $\mu\text{mol/L}$). 1249GG and 1249AA carriers of the ABCC2 gene had mean lamotrigine concentration of 11.6 and 18.9 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Mutation on ABCB1 gene also revealed tendency toward correlation of C1236T genotypes with lamotrigine concentrations (CC: TT, 14,8: 11,1 $\mu\text{mol/L}$) and for C3435T (CC: TT, 13,3: 10,4 $\mu\text{mol/L}$), but the number of TT genotype carriers was a limiting factor for statistical significance.

Conclusions: Preliminary data are suggestive and point that ABCB1 and ABCC2 polymorphisms may influence AED disposition and may account for interindividual pharmacokinetic variability. Due to controversial results reported in literature and still indefinite role of ABC transport proteins in the pharmacokinetics of antiepileptics, we believe that further investigation is necessary on a larger number of patients in order to include these pharmacogenetic indicators in dosing algorithms for antiepileptic drugs.

e-mail: lovricm@kbc-zagreb.hr

S03 – Akreditacija u medicinsko-biokemijskim laboratorijima

S03-1

Postupak akreditacije laboratorija i uloga vodećeg ocjenitelja

Galjanić S¹, Franić Z²

¹Hrvatska akreditacijska agencija, Zagreb

²Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

U radu je ukratko prikazan sustav akreditacije u Republici Hrvatskoj, opisan ustroj Hrvatske akreditacijske agencije (HAA) i njezina uloga u funkcioniranju nacionalne infrastrukture za kvalitetu, koju osim HAA čine i Hrvatski zavod za norme (HZN) i Državni zavod za mjeriteljstvo (DZM) koji obavlja poslove Hrvatskog mjeriteljskog instituta (HMI). Prikazane su glavne djelatnosti i rezultati rada HAA. Detaljnije je opisan proces akreditacije medicinskih laboratorija prema zahtjevima norme HRN EN ISO 15189. Identificirane su i opisane pojedine grupe aktivnosti u procesu akreditacije (prijave, izbor i imenovanje ocjenitelja, ocjenjivanje, odluka o akreditaciji, nadzor). Opisana je uloga vodećeg ocjenitelja u provedbi ocjenjivanja i njegove odgovornosti i zaduženja u različitim fazama postupka (ocjena dokumentacije laboratorija, priprema za ocjenjivanje, organizacija ocjenjivanja u laboratoriju, koordiniranje rada skupine ocjenitelja, formuliranje utvrđenih odstupanja od zahtjeva/kriterija za akreditaciju, izrada završnog izvješća s prijedlogom područja akreditacije, provjera učinkovitosti provedenih popravkih radnja, itd.).

e-pošta: slobodan.galjanic@akreditacija.hr

S03-2

Upravljanje sustavom kvalitete i akreditacija - ciljevi, indikatori i poboljšanja

Zima T

Zavod za kliničku biokemiju i laboratorijsku dijagnostiku, Prvi medicinski fakultet, Karlovo sveučilište, Prag, Češka

Na početku 21. stoljeća postoje definirani prioriteti u laboratorijskoj medicini kao što su automatizacija laboratorija, robotika, informatika, konsolidacija laboratorija, molekularna dijagnostika, analiza slike, pretrage uz bolesnika

S03 – Accreditation in medical biochemistry laboratories

S03-1

Laboratory accreditation process and role of the lead assessor

Galjanić S¹, Franić Z²

¹Croatian Accreditation Agency, Zagreb, Croatia

²Institute for medical research and occupational health, Zagreb, Croatia

The short description of the Croatian accreditation system is presented, as well as the organization of Croatian Accreditation Agency (HAA) and its role as the part of the national quality infrastructure, which besides HAA, consists of the Croatian Standards Institute (HZN) and the State Office for Metrology (DZM).

The results of HAA activities are presented.

The process of accreditation according to the requirements of HRN EN ISO 15189 is described in details.

The main groups of activities within the accreditation process are identified and discussed (application, selection and appointment of assessors, assessment, decision on accreditation, surveillance).

The role of the lead assessor, her/his duties and responsibilities during the assessment procedure were described (document review, preparation for assessment, organization and coordination of on-site assessment, formulation of nonconformities, preparation of final report, proposal for the scope of accreditation, check of corrective actions performed, etc.).

e-mail: slobodan.galjanic@akreditacija.hr

S03-2

Quality management system and accreditation – goals, indicators and improvements

Zima T

Institute Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

At the beginning of the 21st century there are defined priorities in laboratory medicine such as laboratory automation, robotics, informatics, laboratory consolidation, molecular diagnostics, imaging analysis, POCT, and ac-

(engl. *point-of-care testing*, POCT) i akreditacija laboratorija s ciljem poboljšanja kvalitete skrbi za bolesnike. Kvaliteta u zdravstvenoj skrbi predstavlja stupanj izvrsnosti zdravstvene zaštite u odnosu na trenutnu razinu znanja i tehničkog razvoja.

Glavni indikatori kvalitete zdravstvene zaštite su zdravlje populacije, jednake mogućnosti pristupa zdravstvenoj zaštiti, učinkovito pružanje usluga, djelotvornost i pristupnost sustava kao i rezultati koje pruža zdravstvena zaštita. Životni stil, genetski i okolišni čimbenici imaju puno jači utjecaj na zdravlje populacije nego sama zdravstvena skrb.

Laboratorijska je medicina okosnica medicinskog liječenja, dijagnostike ili prevencije. Laboratorijska dijagnostika utječe na 70-80% odluka koje se donose kod bolničke njege, a njen trošak kreće se između 3-5% ukupnih troškova zdravstvene zaštite.

Laboratoriji nastoje poboljšati kvalitetu s ciljem smanjenja učestalosti dijagnostičkih pogrešaka i skraćivanja vremena potrebnog za izdavanje cjelokupnog nalaza, s osiguranom sljedivosti svih laboratorijskih procesa, kako bi se osigurala sigurnost bolesnika i osoblja. Laboratoriji se koncentriraju se na personaliziranu medicinu krojenu prema potrebama svakog bolesnika individualno, težeći ka najvišoj mogućoj kvaliteti usluge. Osnovni zahtjevi prema laboratoriju, s gledišta bolesnika, su dostupnost, razumljivost, brz odgovor, pouzdanost i točnost, pružanje informacija i konzultacija te analiza pritužbi i žalbi.

Prve razine sustava upravljanja kvalitetom (engl. *quality management system*, QMS) u laboratoriju su unutarnja i vanjska procjena kvalitete rada i edukacijske aktivnosti.

Vezano za kvalitetu rada, strategijski planovi IFCC i EFCC uključuju usredotočavanje na akreditaciju laboratorija temeljenu na ISO standardima i u suradnji s Europskom akreditacijskom agencijom te nacionalnim akreditacijskim tijelima. IFCC je prepoznao da norma ISO 15189:2007 – medicinski laboratoriji – posebni zahtjevi kvalitete i kompetencije, obuhvaća sve kriterije procjene navedene u izjavi o politici kvalitete te da kao takva oblikuje temelj za akreditaciju laboratorija. U nekoliko zemalja akreditaciju vrši nacionalno akreditacijsko tijelo. Za svako medicinsko područje koje je obuhvaćeno akreditacijom očekuje se od laboratorija pružanje i cjelokupne usluge što uključuje sve prethodne korake prijeanalitičke, analitičke i postanalitičke faze koje su ključne za pružanje učinkovite i djelotvorne laboratorijske usluge bolesnicima. U sklopu toga očekuje se da medicinski laboratorij može pokazati svoju kompetenciju u tumačenju nalaza provedenih pretraga.

Postoji dakle nekoliko različitih sustava u zemljama EU koji se temelje na nacionalnim sustavima kvalitete s osnovom u normi ISO 15189.

Negativne strane akreditacije su investiranje u opremu, prostor, troškovi akreditacije te vrijeme potrebno za njevu provedbu. Koristi koje ona donosi su standardizacija

akreditacije laboratorija imajući na umu poboljšanje kvalitete skrbi za bolesnike. Kvaliteta u zdravstvenoj skrbi predstavlja stupanj izvrsnosti zdravstvene zaštite u odnosu na trenutnu razinu znanja i tehničkog razvoja.

The main indicators of health care quality are the health of the population, equal opportunities in access to health care, effective provision of services, the efficiency and accessibility of the system and also the results of the health care provided. Lifestyle, genetic and environmental factors have a much higher influence on the health of the population than health care itself.

Laboratory medicine is backbone in the medical treatment, diagnostics or prevention. Laboratory diagnostics has influence on 70-80% of hospital health care decisions and cost between 3-5% of total health care costs.

Laboratory attempts to improve quality aim to reduce diagnostic errors and decrease turn around time with traceability of all laboratory procedures and to assure the safety of patients and staff alike; they concentrate on "tailor-made" or personalised medicine, striving for the highest possible quality service. Basic requirements and criteria for laboratories from client's perspective are availability, comprehensiveness, fast response, reliability and accuracy, information and consultation and analysis of complaints and claims.

First systems or level of QMS in labs are internal and external quality control and educational activities.

Concerning quality, the strategic plans of IFCC and EFCC include focusing of accreditation of labs based on ISO standards and cooperation with European Accreditation and national accreditation bodies. IFCC recognises that ISO 15189:2007 - Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence, encompasses all the assessment criteria specified in the policy statement and as such should form the basis for the accreditation of laboratories. Accreditation is done in several countries by independent National Accreditation Bodies. For each medical field, mentioned in the scope, it is expected that the laboratory provides a full service, which includes all pre-examination, examination and post-examination aspects that are essential to provide an effective and efficient laboratory service to the patients. Within this, it is expected that a medical laboratory is able to demonstrate its competence in interpreting the results of the examinations performed.

There are also different systems in EU countries based on national quality systems which have the basement in ISO 15189.

The negotiations of accreditation are investments to equipment, facilities, expenses with accreditation, time consuming process. The benefits are standardization of all processes, responsibility of each member of team, personal policy, demonstrability of results, systematic evaluation of suppliers, better communication with partners.

svih procesa, odgovornost svakog člana tima, propisana pravila na razini svakog zaposlenika, dokazljivost rezultata, sistematska procjena dobavljača, bolja komunikacija s partnerima.

Kada se govori o kvaliteti rada laboratorijske usluge će biti u središtu pažnje zbog njihovog širokog utjecaja na skrb o bolesnicima. Akreditacija ne govori o tome tko je najbolji, već tko ima sustav standardiziranih procedura. Sustav kvalitete govori o ljudima, te se uspostavlja zbog ljudi.

e-pošta: zimatom@cesnet.cz

Laboratory services will be the centre of attention regarding quality due to their wide ranging impact on the care for patients. Accreditation is not about who is the best, but who have system of standard procedures. Quality system is about people, with people and for people.

e-mail: zimatom@cesnet.cz

S03-3

Unutrašnja neovisna ocjena

Maglić L

Strojarski fakultet, Slavonski Brod

Kvaliteta proizvoda ili usluge je postala važan čimbenik u životu ljudi u industrijskim društvima. Kako bi osigurala kvalitetu proizvoda ili usluge organizacije primjenjuju sustave kvalitete. U cilju pojednostavljenja provođenja sustava upravljanja kvalitetom uvedene su norme koje opisuje zahtjeve za sustave upravljanja kvalitetom. Postupkom audita provjerava se u kojoj mjeri su ispunjeni zahtjevi koji su opisani relevantnom normom.

Općenito, audit je sustavan, neovisan i dokumentiran proces kojim se ocjenjuje stupanj ispunjenja zahtjeva koji su definirani kriterijem audita. Kriterij audita je skup propisa, procedura i zahtjeva koji se koristi kao referenca. Najčešći slučaj je provođenje audita prema zahtjevima norme ISO 9001, ali audit se provode i za mnoge druge norme i propise kao što su ISO 14001, ISO 22000, HACCP. Način organizacije i provođenja audita je uglavnom isti neovisno o kojoj normi se radi, ali postoje i specifičnosti u vezi zahtjeva pojedinih normi i propisa. U ovom radu opisan će se provođenje internih audita s posebnim osvrtom na zahtjeve norme ISO 15189.

Hrvatska norma HRN EN ISO 15189 utvrđuje posebne zahtjeve za kvalitetu i osposobljenost medicinskih laboratorija, a utemeljena je na normama HRN EN ISO/IEC 17025 i HRN EN ISO 9001. U skladu sa zahtjevima HRN EN ISO 15189 provodi se akreditacija medicinskih laboratorija. Tijekom implementacije HRN EN ISO 15189 uočene su poteškoće u provođenju internih audita.

Interni audit je audit koji organizacija provodi na svom vlastitom sustavu upravljanja. U normi HRN EN ISO 15189 interni audit je definiran kao zahtjev 4.14 Unutrašnja neovisna ocjena. U radu su opisane faze internih audita, tehnike auditiranja, zahtjevi za interne auditore, te dokumen-

S03-3

Internal audit

Maglić L

Mechanical engineering faculty, Slavonski Brod, Croatia

Quality is very important factor in life of many people in industrial societies. To ensure product of quality or service, organization apply quality management systems. In order to simplify implementing of quality management systems, standards have been introduced to describe requirements of quality management systems. Audits are used to check level of fulfilment of requirements which are described by relevant standard.

Generally, audit is systematic, independent and documented process by which level of fulfilment of defined requirements is evaluated. Requirements are defined by audit criteria. Audit criteria is group of regulations, procedures and requirements used as reference. Most often case is performing audit related to requirements of standard ISO 9001, but audits are performed for other standards and regulations such as ISO 14001, ISO 22000, HACCP. Organization and performing of audit process is mostly the same, non-related to standard against which audit is performed, but there are some differences related to requirements of relevant standard and regulation. This paper deals with performing of internal audits, particularly related to requirements of standard ISO 15189.

Croatian standard HRN EN ISO 15189, medical laboratories - requirements for quality and competence, is based on standards HRN EN ISO/IEC 17025 and HRN EN ISO 9001. Accreditation of medical laboratories is performed related to requirements of HRN EN ISO 15189. During implementation of HRN EN ISO 15189 some difficulties were noticed at process of internal audit.

Internal audit is audit performed by organization on their management system. Standard HRN EN ISO 15189 define internal audit as requirement 4.14 Internal independent

tacija koja prati proces pripreme audita i dokumentacija koja nastaje tijekom provođenja internog audita. Opisan je postupak izrade upitnih lista visoke i niske razine. Definirani su pojmovi nesukladnosti uočenih na internom auditu. Koristeći konkretne primjere opisan je proces dokumentiranja i nadzora pokrenutih popravnih radnji. Objašnjen je način kreiranja izvještaja s internog audita za upravu laboratorija.

Interni audit je svakako jedan od najvažnijih zahtjeva svakog sustava upravljanja. Cilj ovog rada je omogućiti lakše provođenje internih audita u organizacijama koje primjenjuju zahtjeve norme HRN EN ISO 15189.

e-pošta: lmaglic@brod.sfsb.hr

assessment. In this paper phases of internal audit, audit techniques, requirements for internal auditors and documentation used during internal audit process, are described. Process of creating high level and low level check lists is described. Non-conformities noticed at internal audit are explained. At practical examples, documenting and monitoring of corrective actions process is explained. Internal audit report for laboratory management is described, too.

Internal audit is one of the most important requirements of any management system. Objective of this work is to achieve easier performing of internal audits in organizations that implement requirements of standard HRN EN ISO 15189.

e-mail: lmaglic@brod.sfsb.hr

S03-4

Osiguranje kvalitete postupaka ispitivanja - međulaboratorijske usporedbe

Flegar-Meštrić Z¹, Juretić D²

¹Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

²Hrvatsko društvo medicinskih biokemičara, Zagreb

Prema zahtjevima norme HRN EN ISO 15189:2006 Medicinski laboratoriji - Posebni zahtjevi za kvalitetu i sposobnost, laboratorij mora imati postupke za praćenje kvalitete rezultata ispitivanja koji se mogu ostvariti kroz sudjelovanje u programima ispitivanja osposobljenosti (engl. *proficiency testing*, PT; *external quality assurance*, EQA), sudjelovanjem u međulaboratorijskim usporedbama (engl. *interlaboratory comparison*, ILC), ili na koji drugi način (primjerice, uporabom certificiranih referentnih standarda, ponavljanjem ispitivanja istom ili kojom drugom metodom).

Uloga PT/EQA/ILC programa u poboljšanju kvalitete medicinskih laboratorija vrlo je velika, jer analiza rezultata laboratorija učesnika osigurava neovisnu, objektivnu ocjenu individualnih laboratorija, ocjenu reproducibilnosti primijenjivanih analitičkih metoda na velikom broju laboratorija učesnika, usporedbu različitih analitičkih metoda kroz određeno vrijeme i na različitim geografskim područjima, te stalni nadzor nad aktualnim stanjem struke u području laboratorijske opreme, primijenjene tehnologije i preporučenih analitičkih metoda.

Svaki laboratorij treba odabrati PT/EQA/ILC program u kojem će sudjelovati. To može biti zakonski regulirano ili ovisiti o stručnim preporukama. Pri tome je važno definirati kriterije za odabir PT/EQA/ILC programa koji moraju

S03-4

Assuring quality of examination procedures – interlaboratory comparisons

Flegar-Meštrić Z¹, Juretić D²

¹Institute of Clinical Chemistry, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

²Croatian Society of Medical Biochemists, Zagreb, Croatia

According to requests of standard HRN EN ISO 15189:2006 Medical laboratory - Special requests for quality and qualification, a laboratory must have procedures for monitoring quality of results and examinations, what can be accomplished by participating in quality examination schemes (proficiency testing, PT; external quality assurance, EQA), interlaboratory comparisons (ILC) or in some other way (reference materials usage, repeating examination by the same or some other method).

The role of PT/EQA/ILC schemes in quality improvement of medical laboratories is important because the result analysis of participating laboratories assures an independent and objective evaluation for an individual laboratory, evaluation of reproducibility of applied analytical methods on a large number of participating laboratories, comparison of different analytical methods through certain period of time and on different geographical areas and continuous surveillance of current state on the field of laboratory equipment, applied technology and recommended analytical methods.

Each laboratory should choose a PT/EQA/ILC scheme to take part in. It can be defined by the law or dependent on expert recommendations. It is important to define criteria for choosing a PT/EQA/ILC scheme and those must inclu-

uključivati podatke o sljedivosti kontrolnog materijala, uzorci moraju biti što sličniji uzorcima bolesnika, broj laboratorija učesnika, broj ciklusa, prikaz dobivenih rezultata, edukacijsku vrijednost i dostupnost.

Laboratoriji trebaju pratiti rezultate PT/EQA/ILC programa i analizirati da li je prisutan trend promjena koji može upozoravati na mogući porast nepreciznosti ili prisutan bias karakterističan za pojedina koncentracijska područja. Time se otkrivaju mogući trendovi promjena koje nije moguće otkriti iz pojedinačnih rezultata. Zato se evaluacija PT/EQA/ILC rezultata smatra stalnim mehanizmom poboljšanja kvalitete, koji treba onemogućiti da potencijalne nesukladnosti imaju negativan utjecaj na rezultate pacijenata.

Svaki će laboratorij povremeno dobiti neprihvatljive PT/EQA/ILC rezultate. Oni mogu biti posljedica neodgovarajućeg postupanja s uzorkom ili posljedica analitičkih pogrešaka. Laboratorij mora imati pisani postupak za slijed aktivnosti koje je potrebno provesti, a koje moraju uključiti analizu mogućeg utjecaja na rezultate pacijenata, temeljitu analizu nastale nesukladnosti, pokretanje popravne radnje, provođenje nadzora kojim će se utvrditi efikasnost popravne radnje. Prema objavljenim podacima za oko 19-24% neprihvatljivih rezultata provedenim detaljnim ispitivanjima nije se uspio razjasniti uzrok koji je doveo do neprihvatljivog rezultata u PT/EQA/ILC programu. Laboratorij je odgovoran za izbor PT/EQA/ILC programa, rukovanje PT/EQA/ILC uzorcima na isti način kao s uzorcima pacijenata, analizu neprihvatljivih rezultata koja uključuje: ispitivanja mogućeg utjecaja na rezultate pacijenata, pokretanje popravnih radnji, praćenje uspješnosti popravnih radnji, praćenje rezultata PT/EQA/ILC programa u svrhu utvrđivanja trenda promjena ili biasa, arhiviranje zapisa o provedenim programima i svim ispitivanjima provedenim za neprihvatljive rezultate.

Prema Uputama Hrvatske akreditacijske agencije za provedbu međulaboratorijskih ispitivanja i drugih usporedbi laboratorija, preporučeni minimum sudjelovanja akreditiranih laboratorija, u skladu s dokumentima EA-a i ILAC-a, je jednom za svaku pojedinu disciplinu obuhvaćenu područjem akreditacije, unutar važenja Potvrde o akreditaciji (5 godina). Laboratorij mora imati dokumentirane postupke za analizu rezultata između laboratorijskih programa i za provedbu odgovarajućih popravnih i/ili preventivnih radnji. Obveza je laboratorija u pisanome obliku obavješćivati HAA o sudjelovanju i o rezultatima svog sudjelovanja u PT/EQA/ILC programima.

Sudjelovanje u PT/EQA/ILC programima doprinosi stalnom poboljšanju kvalitete laboratorija jer se kroz praćenje aktualnog stanja struke preporučuju novi standardi, prati njihova primjena, potiče izrada novih preporuka i provodi stalna edukacija laboratorijskog osoblja.

de data about control material traceability, control samples must be as similar as possible to patients' samples, number of participating laboratories, number of surveys, review of obtained results, educational value and availability.

Laboratories must monitor PT/EQA/ILC scheme results and analyze whether there is trend of changes that warns about possible imprecision or bias increase attributable to some concentration levels. This way, possible trends of changes can be revealed what is impossible to see from individual results. Therefore, evaluation of PT/EQA/ILC scheme results is considered a continuous mechanism of quality improvement which should eliminate that potential nonconformities have negative impact on patient's results.

Every laboratory will occasionally obtain unacceptable PT/EQA/ILC results. They can arise from inadequate sample handling or analytical mistakes. Laboratory must have a written sequence of activities which must be performed and which must include analysis of potential impact on patient's results, thorough analysis of occurred nonconformity, initiating a corrective action, surveillance implementation to evaluate this corrective action. According to published literature there are about 19-24% of unacceptable results where detailed examinations could not explain what exactly brought to that unacceptable result within a PT/EQA/ILC scheme.

Laboratory is responsible for the PT/EQA/ILC scheme choice, handling with PT/EQA/ILC samples in the same way as with patient's samples and analysis of unacceptable results which includes: examination of possible impact on patient's results, initiating of corrective actions, PT/EQA/ILC results monitoring in order to determine trends of change or bias, storing documentation about schemes and all examinations for unacceptable results.

According to the guidelines of Croatian Accreditation Agency (HAA) for interlaboratory examination implementation and other laboratory comparisons the recommended minimum period for participation of accredited laboratories in concordance with EA and ILAC documentation is once for each individual discipline included in accreditation area, within the validity period of the Accreditation certificate (5 years). Laboratory must have documented procedures for result analysis between laboratory programs and for implementation of adequate corrective and/or preventive actions. It is laboratory's duty to inform the HAA in written on participation in PT/EQA/ILC schemes and achieved results.

Participation in PT/EQA/ILC schemes contributes to continuous quality improvement of laboratories because through monitoring of the current state of the profession new standards are recommended, their implementation is monitored, making of new guidelines is encouraged and constant education of laboratory staff is implemented.

e-pošta: zlata.mestric@zg.t-com.hr

e-mail: zlata.mestric@zg.t-com.hr

S03-5

Tehnički ocjenitelji i eksperti

Vukasović I

Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

U postupku dobivanja akreditacije, jedna od aktivnosti je i postupak ocjenjivanja. Provode ga, u organizaciji zainteresiranoj za dobivanje akreditacije, nepristrani i neovisni ocjenitelji. Ocjenitelje imenuje akreditacijska agencija temeljem unaprijed utvrđenih kriterija poput poznavanja akreditacijske procedure i njenih ciljeva te poznavanja procedure ocjenjivanja u laboratoriju. Obzirom na ulogu koju obnašaju, ocjenitelji su podijeljeni u kategorije: 1) vodeći; 2) tehnički ocjenitelj; 3) ekspert; 4) kandidat za ocjenitelja (ocjenitelj vježbenik).

Vodeći ocjenitelj ima ukupnu odgovornost za utvrđene ocjenjivačke aktivnosti. Prije samog ocjenjivanja mora načiniti plan ocjenjivanja u kojem će istaknuti što se ocjenjuje (odjel, odsjek, područja), te dodijeliti ocjeniteljima aktivnosti ovisno o njihovim znanjima uključujući i ocjenitelja vježbenika za kojeg mora načiniti detaljne upute. Vodeći je ocjenitelj zadužen i za nadziranje rada tehničkog ocjenitelja i ocjenitelja vježbenika. Prema njegovoj preporuci se ocjenitelj vježbenik može promovirati u tehničkog ocjenitelja za naredno ocjenjivanje. Vodeći ocjenitelj sudjeluje u ocjenjivanju sustava upravljanja kvalitetom u laboratoriju procjenjujući sukladnosti sa standardom koji je u primjeni (ISO 15189). Zadaća je vodećeg ocjenitelja da provjeri primjenu i učinkovitost dokumentiranog sustava upravljanja kvalitetom te da načini zapise o tome u prikladne obrasce. Vodeći ocjenitelj prikuplja i sažima izvještaje i ostale dokumente koje su prikupili tehnički ocjenitelj/i i ekspert/i u jedinstveni izvještaj. Nesukladnosti koje su uočene tijekom ocjenjivanja posebno se izdvajaju.

Tehnički ocjenitelj mora jasno razumijevati područje laboratorijskog rada i aktivnosti koje se ocjenjuju. Mora poznavati zahtjeve standarda kako bi mogao procijeniti sukladnost laboratorijske dokumentacije sa standardom te poznavati pravila i kriterije akreditacijske agencije. Tehnički ocjenitelj mora provjeriti jesu li postupci, radne upute, mjerni postupci, zapisi zaista u primjeni kako je propisano, kakva im je učinkovitost te zapažanja, uključujući i nesukladnosti, unosi u prikladne obrasce.

Eksperti su osobe koje ne moraju nužno biti upoznate sa sustavom upravljanja prema određenom standardu. Tehničkom ocjenitelju pružaju specifična znanja i ekspertize s obzirom na područje akreditacije koje treba biti ocijenjeno. Vezano uz ocjenjivanje medicinsko-biokemijskih laboratorija eksperti se pridružuju tehničkom ocjenitelju

S03-5

Technical assessors and experts

Vukasović I

University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

On-site assessment is the one of the activities to verify compliance with all requirements during the accreditation procedure. It is implemented by impartial and independent assessors in applicant laboratory. The assessors are appointed by the accreditation agency based on pre-defined criteria, such as full awareness of the accreditation process, its objectives and the on-site assessment procedure. Regarding their technical knowledge and experience, the assessors are divided into categories as follows: 1) lead assessor; 2) technical assessor; 3) technical expert; 4) potential assessor (observer).

A lead assessor has overall responsibility for the established activities. Before starting the assessment the lead assessor should prepare an assessment schedule to include sections/areas/activities to be assessed and assignment to various assessors based on their expertise. The potential assessor (observer) should also be guided about the conduct of assessment. The lead assessor is required to monitor the performance of technical assessor(s) and the observer. He shall recommend whether the observer is capable to perform the role of a technical assessor in his next visit. The lead assessor must review the document laboratory's quality system to verify compliance with the standard requirements (HRN EN ISO 15189). He should assess implementation and effectiveness of the quality system, and record observations in the appropriate form. He has to collect reports and documents from all technical assessors including his own report and compile it. A consolidated statement of nonconformities raised during the assessment shall be listed.

The technical assessor should clearly understand the areas/activities to be assessed. He must review the laboratory's documented system to verify compliance with the standard requirements and related accreditation agency criteria. He should verify that the documented procedures, work instructions, test methods, records are indeed implemented and effective, as described and record observations in appropriate form. All nonconformities must be identified and reported.

The technical expert must be experienced in specific laboratory fields such as laboratory immunology, molecular diagnostics and toxicology. He should not necessarily know the standard although very often the expert is the technical assessor, too.

za područja imunologije, molekularne dijagnostike i toksikologije.

Vodeći, ali i tehnički ocjenitelji moraju steći iskustvo provođenja ocjenjivanja uz iskusnije ocjenitelje. Stoga u skupini ocjenitelja mogu biti i ocjenitelji-vježbenici koji se nalaze u postupku praktičnog dijela izobrazbe za ocjenitelje. Vježbenici nisu obavezni, ali uobičajeno prilažu izvještaj vodećem ocjenitelju.

Osim stručnih znanja, ocjenitelji moraju imati i određene osobine: komunikativnost, realno sagledavanje situacije, pravilno korištenje raspoloživog vremena, zaključivanje temeljem činjenica. Od ocjenitelja se očekuje da prevlada moguća ometanja uz davanje odgovora i prikaz dokumentacije koju nije zatražio, te prikladno reagiranje u slučajevima konflikta i usuglašavanje mogućih nejasnoća. Pitanja koja ocjenitelj postavlja moraju biti jasna i nedvosmislena poput: kako, gdje, tko, pokažite.

Nakon donošenja odluke o akreditaciji provode se nadzorna ocjenjivanja od strane istog vodećeg ocjenitelja, s ciljem utvrđivanja poboljšanja u sustavu upravljanja kvalitetom te provjere učinkovitosti provedenih popravkih radnji.

e-pošta: ines.vukasovic@gmail.com

The potential assessor (observer) will be assigned to accompany a lead assessor and technical assessor(s) as per the provided schedule. He shall be guided by the lead assessor and the technical assessor(s). He is not required to submit any report; however, his form may be submitted to the lead assessor.

Besides professional knowledge the assessor should possess specific skills: communication, realistic situation assessment, the proper use of available time, facts-based making conclusions, overcoming possible interference with the responses. It has been expected from the assessor to overcome possible interference with giving answers and presentation of documents he didn't request, and to react appropriately in case of conflicts and reconciling possible indistinctness. The assessor must raise clear and unambiguous questions, such as: how, where, who, show. The Scope of Accreditation to be granted to the Laboratory must be checked thoroughly with necessary recommendations. Any deletions or alterations in the scope must be clearly brought out and signed by both the laboratory representative and the assessor.

e-mail: ines.vukasovic@gmail.com

S04 – Laboratorijska hematologija

S04-1

Klinička važnost novih parametara krvnih stanica

Jakšić B

Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

U kliničkim su laboratorijima u širokoj uporabi automatski brojači krvnih stanica koji omogućuju isplativo testiranje velikog broja uzoraka. Njihovo kontinuirano poboljšanje visokom preciznošću, točnošću i provjerljivošću kvantitativnih analiza postavilo je nove standarde u kliničkoj praksi. Tijekom godina smanjuje se potreba za komplementarnim analizama (obično neautomatizirane morfološke analize krvi) zbog činjenice da se sve više aspekata kvalitativne morfološke procjene zamjenjuje provjerljivim i preciznim kvantitativnim mjerenjima. Štoviše, napredak u tehnologiji pružio je broj novih parametara u automatiziranoj analizi krvnih stanica. Za kliničku hematologiju koja svoje tradicionalne početke ima u morfologiji krvnih stanica ovo postaje novi izazov. Morfologija daje važan (vjerojatno još uvijek i najvažniji) doprinos procjeni hema-

S04 – Laboratory hematology

S04-1

Clinical relevance of new blood cells parameters

Jakšić B

Department of Internal Medicine, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

Automated blood cell counters are widely available and allow high volume and cost effective testing in clinical laboratories. Their continuous improvement in performance with high precision, accuracy and reproducibility of quantitative analyses has set up new standards in clinical practice. Over years, the need for complementary analyses (usually manual analysis of blood morphology) is decreasing due to the fact that more and more aspects of "qualitative" morphological assessments are replaced by reproducible and precise quantitative measures. Moreover, advances in technology have provided a number of new parameters in automated evaluation of blood cells. For clinical hematology, traditionally rooted in blood cell morphology, this is emerging as a new challenge.

toloških poremećaja i njihovoj klasifikaciji. To je zbog vrlo iscrpne procjene parametara krvnih stanica, uzimajući u obzir različite kvalitativne i kvantitativne aspekte. Međutim, tradicionalna je morfologija također u kontinuiranoj evoluciji, kompjuterski potpomognuta analiza slike, razne procedure bojanja, imunološke i molekularne tehnike i sl., tako da hematološka citologija postaje sve kompleksnija. U biti, i automatizirana analiza krvnih stanica i citološka morfologija se svojim razvojem približavaju jedna drugoj. Citologija pokušava opisati i istražiti elemente procesa donošenja morfoloških odluka koji bi se mogli kvantificirati i stoga su pogodni za precizno i pouzdano automatsko testiranje. Prema istom principu, automatske analize rabe sve sofisticiranije multivarijantne pristupe kako bi definirale potrebne skupove podataka te na taj način imitiraju proces donošenja odluka u višedimenzionalnom sustavu.

Klinička važnost novih parametara krvi mora se procijeniti metodološki ispravnim kliničkim procesom istraživanja. Analiza jednostavnih korelacija s drugim testovima nije unutar standarda. Za diferenciranje bijelih krvnih stanica korelacija nezavisne morfološke procjene i ROC analize mogla bi biti odgovarajuća da pokaže kako automatska analiza može zamijeniti neautomatsku analizu na željenoj razini (to je samo po sebi klinički važno ako se morfologija koristi za postavljanje dijagnoze). Međutim, nemogućnost korelacije s morfologijom ne mora predstavljati i nemogućnost korelacije s važnom kliničkom karakteristikom promatranog poremećaja. Drugim riječima, novi parametri mogu biti važniji od tradicionalne morfologije za klasifikaciju i posljedično liječenje te samim time relevantniji. Primjer promjenjivih paradigmi po tom pitanju daje nova klasifikacija hematoloških malignosti Svjetske zdravstvene organizacije koja (djelomično) počiva na molekularnim osnovama.

O kliničkim važnostima i potencijalnim metodološkim zamkama raspravljati ćemo na primjerima objavljenih procjena parametara crvenih stanica (RDW, CHr, CHm, %HYPO, %HYPOm, %lowCHm; NRBC; IRF, LRF, MFR, HFR), trombocita (MPV, retikulirani trombociti) i bijelih krvnih stanica. Relativno mali broj izvještaja s procjenom novih parametara automatskih hematoloških analizatora ukazuje na manjak interesa istraživača za suradnjom na tom polju među kliničarima, citolozima i laboratorijskim stručnjacima. Svjesnost o novom potencijalu trebala bi se spremnije širiti među kliničarima.

e-pošta: bjaksic@mef.hr

The morphology is an important (probably still the most important) contributor to the evaluation of hematological disorders and their classification. This is due to the imminent comprehensive evaluation of blood cells taking into account various qualitative and quantitative aspects. However, the traditional morphology is also in continuous evolution, corroborating computer assisted image analysis, various staining procedures, immunological and molecular techniques etc., so that the discipline of hematological cytology is becoming more and more complex. In fact, both automated blood cell analyses and cytological morphology have converging evolution. The cytology is trying to describe and explore elements for morphological decision making process that could be quantifiable and therefore suitable for precise and reliable automated testing. By the same token, automated analyses are using more and more sophisticated multivariate approaches to define necessary clusters, thus mimicking decision process in multidimensional system.

Clinical relevance of novel parameters of blood cells must be assessed in methodologically sound clinical research process. Analysis of simple correlation with other tests is suboptimal. For automated white blood cells differential, the correlation with independent morphological assessment and ROC analysis may be adequate to show that automated analysis can substitute manual analysis at the desired level (this itself is clinically relevant if the morphology is used for diagnosis). However, failure to correlate with morphology may not be the failure to correlate with important clinical characteristic of a disorder under study. In other words, the new parameter may be more important for classification and consequent treatment than traditional morphology and therefore clinically more relevant. The example of changing paradigm in this direction is the new WHO classification of hematologic malignancies, based (in part) on molecular grounds. Clinical relevance and potential methodological pitfalls will be discussed on examples of published evaluation of red blood cell parameters (RDW, CHr, CHm, %HYPO, %HYPOm, %lowCHm; NRBC; IRF, LRF, MFR, HFR), platelets (MPV, "reticulated platelets"), and white blood cells. Relative low number of reports of evaluating the new parameters derived from automated hematological analyzers points to the lack of interest in the research community for cooperation in this field among clinicians, cytologists and laboratory experts. The awareness of new potential should be more readily disseminated among clinicians.

e-mail: bjaksic@mef.hr

S04-2

Prikaz nekih klinički značajnih parametara hematološkog analizatora ADVIA 2120

Perović E

Opća bolnica Zadar, Zadar

Pri određivanju hematoloških parametara analizator ADVIA 2120 rabi tehnologiju mjerenja rasapa svjetlosti laserske zrake. Prema Mievoj teoriji rasapa svjetlosti na homogenim sferama, rasap laserske svjetlosti mjeren pri malom (2-3) i pri velikom kutu (5-15) za svaku pojedinačnu stanicu pretvara se u mjeru volumena i mjeru unutarnje strukture (za eritrocite – hemoglobin, za leukocite – lobularnost jezgre, za trombocite – granule).

U analitičkim sustavima koji rabe jednodimenzijску analizu trombocita prisutan je metodološki problem – razlikovanje trombocita od netrombocitnih čestica usporedive veličine, a to su najčešće fragmentirani eritrociti, mikrociti i stanični debris, a nadalje, dolazi do preklapanja mikrocita i makrotrombocita.

Dvodimenzijска analiza trombocita donijela je nove parametre, trombocitne indekse. Uz mjeru veličine trombocita, MPV, postoje MPM (prosječna masa trombocita), MPC (prosječna koncentracija sadržaja trombocita), te mjere njihovih raspodjela PMDW i PCDW. Primjena trombocitnih indeksa našla je svoje mjesto pri određivanju aktivacije trombocita pošto se u tom procesu mijenja oblik trombocita, oni bubre i degranuliraju.

Od trombocitnih indeksa, MPC se pokazao kao biljeg aktivacije trombocita koji negativno korelira s povećanjem ekspresije CD 62P. Ovo smanjenje MPC može se inhibirati s ridogrelom, specifičnim inhibitorom sinteze tromboksana. Primjena ostalih trombocitnih indeksa se pokazala korisnom pri procjeni oštećenja pohranjenih trombocita, a time i kvalitete trombocitnog koncentrata. Određivanje trombocitnih indeksa može poslužiti pri određivanju stupnja rizika i kao pokazatelj odgovora na antiagregacijsku terapiju kod pacijenata koji se podvrgavaju angioplastičnim zahvatima. Trombocitni aktivacijski indeksi promijenjeni su i kod pacijenata s akutnim zatajenjem srca, u ozbiljnoj hipertenzivnoj bolesti, a pokazali su prognostičku informaciju za preživljavanje pacijenata koji su imali DIK. Analiza leukocita odvija se na dva različita mjerna kanala, na jednom se mjeri aktivnost mijeloperoksidaze i veličina stanica, a na drugom leukocitnom kanalu određuje se granularnost jezgri i veličina stanica. Činjenica da se blasti mogu analizirati na oba mjerna kanala ukazuje na povećanu osjetljivost i specifičnost ovog parametra, koji se još uvijek na hematološkim analizatorima izražava kao oznaka upozorenja.

S04-2

Overview of some clinically relevant parameters of hematological analyzer ADVIA 2120

Perović E

Zadar General Hospital, Zadar, Croatia

Hematological analyzer ADVIA 2120 uses laser light scatter technology for determination of blood count and differential. Using the Mie theory of light scattering for homogenous spheres, the low angle (2-3) and the high angle (5-15) scatters for each cell are transformed into volume and inner structure values (for erythrocytes - hemoglobin, for leukocytes - nucleus lobularity and for platelets - granules).

Conventional analytical systems for platelet counting usually are based on 1-dimensional cell size analysis and therefore methodological problem appears - ability to discriminate platelets from nonplatelet particles of comparable size. Those are usually fragmented RBCs, microcytes, debris and there is overlapping of microcytes and giant platelets.

2D-platelet analysis reveals the new parameters - platelet indices: MPV is a measure of size, MPC is mean platelet component concentration, MPM is mean platelet mass, PCDW is platelet component distribution width and PMDW is platelet mass distribution width. The use of platelet indices found its place in the assessment of in vitro platelet activation because during this process platelets undergo shape change, swelling and degranulation occurs.

Among platelet indices, MPC is the marker of platelet activation, which negatively correlates with the increase in the expression of CD 62P. This decreasing of MPC could be inhibited by Ridogrel, a specific inhibitor of thromboxane synthesis. Application of other platelet indices showed to be useful in the assessment of platelet storage lesion, and thus the quality of platelet concentrate. Determination of platelet indices can be used for defining high risk patients and to monitor platelet response to anti-platelet therapies in patients undergoing angioplasty. Platelet activation indices are changed and in patients with acute heart failure, in severe hypertensive disease, and showed the prognostic information for survival of patients who had DIC.

Analysis of WBC takes place on two different measurement channels, one to measure myeloperoxidase activity and size of cells, and another to measure nucleus granularity and size of cells. The fact that blast cells could be analyzed in both measuring channels indicates increased sensitivity and specificity of this parameter, which is still in hematological analyzer expressed as flag parameter.

Velike peroksidaza-negativne stanice rabe se za dijagnosticiranje i praćenje akutnih leukemija i mijelodisplastičnog sindroma, a smatraju se prognostičkim čimbenikom u B-KLL i u virusnim infektivnim bolestima.

LUC populacija raste tijekom neutropenične faze nakon primjene kemoterapije i tijekom faze oporavka. Apsolutni broj LUC stanica pozitivno korelira s apsolutnim brojem blasta, CD 34+ i CD3+/CD4+ stanicama prije nadir faze tijekom kemoterapijskog ciklusa. Nakon te faze LUC stanice pokazuju pozitivnu korelaciju s CD2+/CD56+ stanicama (NK-stanice).

LUC stanice pokazuju negativnu korelaciju s brojem neutrofila i s parametrom MPXI. MPXI se pokazao kao potencijalni biljeg za praćenje aktivnosti G-CSF, on raste u neutropeničnih pacijenata liječenih s G-CSF, a pokazuje naglo smanjenje u prenadir fazi. Postotak LUC stanica i MPXI su biljezi nadir faze i mogu pomoći u predviđanju trajanja neutropenije.

Prognostički značaj LUC stanica i MPXI je pokazan kod pacijenata koji se oporavljaju od znatne neutropenije uzimanjem G-CSF. Brže se oporavljaju pacijenti koji u prenadir fazi imaju niski MPXI, povećan broj blasta i CD34+/CD45+ stanica, te veliki porast LUC stanica.

e-pošta: edi_perovic@inet.hr

The large unstained (peroxidase-negative) cells are used for diagnosing and monitoring of acute leukemia and myelodysplastic syndrome, considered to be a prognostic factor in B-CLL and in viral infectious diseases. LUC population increases during neutropenic phase and during recovery phase after standard doses of chemotherapy. LUC absolute number positive correlate to the absolute number of blast, CD 34+ and CD3+/CD4+ cells before nadir phase during chemotherapy cycle. After this phase LUC cells show a positive correlation with CD2+ / CD56+ cells (NK-cells).

LUC cells showed a negative correlation with the number of neutrophil granulocytes and with the MPXI (myeloperoxidase index). MPXI was found to be a potential biomarker for monitoring the clinical activity of G-CSF, it grows in patients with neutropenia treated with G-CSF, and shows a rapid decrease in prenadir phase of chemotherapy. Percentage of LUC cells and value of MPXI are markers of the nadir phase and may be helpful in predicting the duration of neutropenia. Prognostic significance of LUC cells and MPXI was shown in patients who are recovering from significant neutropenia taking G-CSF. The fast recovering patients show prenadir phase hematological profile: low MPXI, increased number of blasts and CD34+/CD45+ cells, and a high increase of LUC cells.

e-mail: edi_perovic@inet.hr

S04-3

Usmjeravanje protokola analitičkih podataka: *Case Manager* kombinira laboratorijske podatke i kliničke simptome

Tornow T

Sysmex Europe GmbH, Marketing Diagnostic Concepts, Norderstedt, Njemačka

Zbog sve većeg broja dostupnih parametara i metoda u suvremenom laboratoriju kliničarima postaje sve teže pratiti i biti u mogućnosti donijeti odluku o tome što je potrebno i – što je još važnije – što je moguće?

Primjerice, Sysmexov novi vrhunski analizator XE-5000 Case Manager nudi ukupno 79 parametara za analiziranje pune krvi i tjelesnih tekućina. Neki od novije proširenih parametara kao npr. nezreli trombociti (engl. *immature platelets*, IPF) dokazali su tijekom zadnjih godina svoju kliničku upotrebljivost. No njihov potencijal još nije poznat svim korisnicima u laboratoriju niti kliničarima na odjelu. Štoviše, često se dogodi da je specifična kombinacija pa-

S04-3

Canalising the data flood: The Case Manager combines laboratory data with clinical knowledge

Tornow T

Sysmex Europe GmbH, Marketing Diagnostic Concepts, Norderstedt, Germany

With the ever growing number of available parameters and methods in the modern laboratory it is becoming more and more difficult for the clinician to keep track and also to be able to decide: What is necessary and - more importantly - what is possible?

Sysmex' new top end analyzer the XE-5000 Case Manager for example now offers a total of 79 parameters for whole blood and body fluid analysis. Some of the newer extended parameters like the immature platelets (IPF) have proven their clinical utility in recent years. But their potential is not known to all users in the lab or to clinicia-

rametara i rezultata od ključnog značaja za određenu dijagnozu.

S novim dijagnostičkim konceptom XE-5000 Case Manager donosi rješenje tog problema. To je prvi hematološki analizator s integriranim dijagnostičkim algoritmima za lakše tumačenje rezultata bolesnika i lakše praćenje terapije. On objedinjuje značajke novog načina rada, napredne analitičke parametre s ispitanim kliničkim parametrima kao što su nezreli granulociti (engl. *immature granulocytes*, IG) ili sadržaj hemoglobina u retikulocitima (engl. *haemoglobinisation of reticulocytes*, RET-He) i dostupne informacije o bolesniku te obavještava korisnika o specifičnim stanjima i slučajevima bolesnika. Analizator daje primjer slučaja, daje informaciju o bolesti u podlozi, o važnim parametrima i dijagnostičkom procesu. *Case Manager* kao takav pomaže liječniku u laboratoriju ne samo kod izvještavanja već i u tumačenju važnih kliničkih informacija, te vrlo učinkovito pomaže kliničarima na odjelu u brzom postavljanju dijagnoze i terapijskog praćenja.

e-pošta: Tornow.Tanja@sysmex-europe.com

ns on the ward just yet. Moreover, often a specific combination of parameters and results is essential for certain diagnoses.

With a new diagnostic concept the XE-5000 Case Manager is introducing a solution to this problem. It is the first haematology analyzer with integrated diagnostic algorithms for easier patient results interpretation and therapy monitoring. It combines new product performance specifications, advanced analytical parameters with proven clinical utilities like immature granulocytes (IG) or the haemoglobinisation of reticulocytes (RET-He) and available patient information, and notifies the user of specific patient cases and conditions. It reports an example case, supplies information about the underlying disease, the relevant parameters and the diagnostic process. As such the Case Manager assists the lab physician not only to report but also to interpret the relevant and important clinical information, supporting the clinician on the ward most efficiently in quick diagnosis and therapy monitoring.

e-mail: Tornow.Tanja@sysmex-europe.com

S04-4

Ograničenja i mogućnosti hematoloških analizatora u praćenju izrazite trombocitopenije

Tandara L

Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Split, Split

Rutinski hematološki analizatori (HA) primjenjuju nekoliko načela brojanja trombocita: načelo impendancije, optičko načelo i imunološko načelo. Iako je učinjen znatan napredak HA u određivanju broja trombocita (hidrodinamičko fokusiranje, mjerenje rasapa svjetlosti pod dva kuta, pomični prag razdvajanja eritrocita i trombocita) neki problemi još uvijek nisu u potpunosti riješeni. Uzrok interferencije najčešće je prisutnost čestica koje veličinom odgovaraju trombocitima poput mikrocita, fragmenata eritrocita, fragmenata citoplazme leukocita ili imunih kompleksa koji mogu pogrešno biti uključeni u broj trombocita. U nekim patološkim stanjima trombociti mogu biti izrazito veliki pa iz tog razloga neće biti uključeni u broj trombocita. Neki HA koriste istovremeno dva različita načela, a razlika u broju trombocita dobivena različitim načelima upozorava na moguću interferenciju. Internacionalna referentna metoda za određivanje broja trombo-

S04-4

Possibilities and limitations of haematology analyzers in the severe thrombocytopenic range

Tandara L

Department of Laboratory Diagnostics, Split University Hospital Centre, Split, Croatia

Routine haematology analyzers (HA) employ several technologies to count platelets: impedance principle, optical light scattering, optical fluorescence and automated immunoplatelet CD61 count. Although considerable improvement has been made (fitted curve of PLT histogram, changing threshold between PLT and RBC, multi angle scatter) some problems considering the PLT counting persist. The major problem is discrimination of PLT from similar sized particles such as RBC microcytes, RBC fragments, WBC cytoplasmic fragments or immune complexes that may be erroneously included in platelet count. In some pathological situations PLT demonstrate high volume and for that reason may be excluded from PLT count. Some HA combine two principles and simultaneously determine PLT count by both principles, so discrepancies between the two counts generate an alert flag suggesti-

cita je protočna citometrija koja koristi dva fluorescentno obilježena monoklonska protutijela na površinske antigene trombocita (CD61 i CD41). Broj trombocita se određuje iz omjera broja trombocita i eritrocita.

Najčešći razlog za primjenu koncentrata trombocita je spriječavanje krvarenja u bolesnika s trombocitopenijom ili poremećenom funkcijom trombocita. Dugo je vremena transfuzijski prag za profilaktičnu transfuziju trombocita bio broj trombocita $< 20 \times 10^9/L$. Suvremena je preporuka da se s transfuzijom započne kada je broj trombocita $< 10 \times 10^9/L$ kod bolesnika koji nemaju dodatne čimbenike rizika kao što su nagli pad broja trombocita, povišena tjelesna temperatura, sepsa ili drugi poremećaji zgrušavanja. Točnost određivanja broja trombocita presudna je za donošenje odluke o profilaktičnoj transfuziji trombocita. Nažalost, utjecaj interferencije u ovom izrazito niskom području može biti velik jer u nekim uzorcima broj interferirajućih čestica može biti veći od stvarnog broja trombocita. Optimalni prag za profilaktičnu transfuziju trombocita kod hematoloških pacijenata još uvijek je predmet brojnih studija.

Nekoliko studija ispitalo je točnost HA u izrazito niskom području (trombociti $< 20 \times 10^9/L$) uspoređujući broj trombocita dobiven na rutinskim HA s brojem trombocita dobivenim referentnom metodom. Rezultati naglašavaju netočnost HA u ovom niskom području, a većina tehnologija ima tendenciju odstupanja prema višim vrijednostima procjenjujući broj trombocita u uzorku. Uočene su i značajne razlike u rezultatima dobivenim na istom tipu analizatora, ali u različitim laboratorijima. Ove razlike pripisane su razlici u kalibraciji instrumenata. Preporučeno je stoga da svaki laboratorij odredi točnost različitih analizatora koje koristi i to u području preporučenog praga za profilaktičnu transfuziju. Najbolje slaganje s referentnom metodom pokazala je u nekoliko ispitivanja automatska imunološka metoda (analiza CD61) dostupna na (Cell Dyne Sapphire, Abbott), što se i očekivalo, budući da se obje metode zasnivaju na istom načelu iako sa značajnim metodološkim razlikama.

Nova referentna metoda koja je zamijenila staru, mikroskopsku metodu s faznim kontrastom, trebala bi osigurati odgovarajući referentni materijal za kalibraciju HA u trombocitopeničnom području, kao i adekvatan kontrolni materijal za isto područje. Kada bi se u ovom niskom području povećala pouzdanost brojanja trombocita, bilo bi moguće sniziti prag za profilaktičnu transfuziju, ne izlagati pacijenta nepotrebno krvnim pripravcima te sačuvati zalihe trombocitnih pripravaka za pacijente kojima je transfuzija neophodna.

e-pošta: leida.tandara@gmail.com

ng the presence of sample interference. International Reference Method (IRF) for PLT counting is immunological method using flow cytometry, two monoclonal antibodies to surface PLT antigens (CD61 and CD41) conjugated to fluorophore. PLT count is derived from PLT/RBC ratio.

The use of prophylactic platelet transfusion for patients without bleeding is based on a threshold principle. The optimal threshold for prophylactic platelet transfusions in haematology patients is still not clear. For a long time a threshold of $20 \times 10^9/L$ has been used. At present a trigger of $10 \times 10^9/L$ is generally recommended for thrombocytopenic patients without additional risk factors such as sepsis, concurrent use of antibiotics or other abnormalities of haemostasis. Accurate platelet count is critical in clinical practice to facilitate decisions at prophylactic platelet transfusion thresholds. The impact of interferences at these low level becomes higher because number of interfering particles in sample may even exceed the true number of platelets.

Several studies compared PLT counts obtained by available routine counting technologies and IRF method at very low platelet counts (PLT $< 20 \times 10^9/L$). Studies highlight the inaccuracies of HA at this low level. Majority of methods tended to overestimate the platelet count. In different studies automated CD61 Immunoplatelet count, routinely available on only one type of HA (Cell Dyne Sapphire, Abbott), gave the best agreement with IRF which is not unexpected because both immunological methods are measuring the same parameter although with some methodological differences. There were also significant differences in PLT count between the same type of analyzer at different centers, which were attributed to calibration differences. It is concluded that haematology laboratories should establish the accuracy of different HA used in laboratory at the recommended transfusion thresholds in clinical practice.

New IRF, replaced the old manual phase microscopy method, should provide a suitable reference material to improve the calibration of HA in thrombocytopenic range as well as adequate QC material and potentially have an impact on platelet transfusion decision making. If there is a confidence in the platelet count at low levels, then it would be possible to lower safely the prophylactic transfusion trigger and reduce platelets transfusions to only those that are necessary, reduce patient exposure to blood component and conserve transfusion resources.

e-mail: leida.tandara@gmail.com

S04-5

Nove tehnologije i inovacije na području laboratorijske hematologije

Simon R

Cellular Analysis Beckman Coulter Eurocenter, Nyon, Švicarska

Autor nije poslao sažetak.

S04-5

The new technologies and innovations in Laboratory Hematology

Simon R

Cellular Analysis Beckman Coulter Eurocenter, Nyon, Switzerland

The author did not provide an abstract.

S05 – Molekularna dijagnostika

S05-1

Biologija u kliničkoj praksi: od molekularne dijagnostike do teragnostike

Barišić K

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju, Zagreb

Razvoj molekularne dijagnostike može se pratiti kroz tri razdoblja: razdoblje prije projekta ljudskog genoma, druga faza predstavlja razdoblje nakon objavljivanja slijeda nukleotida ljudskog genoma te treća faza, koju možemo nazvati teragnostika.

U prvoj fazi razvoja značajan je utjecaj genetike na razvoj molekularne dijagnostike. Genetika je postala sastavni dio moderne medicine od kada su Watson i Crick 1953. godine opisali model strukture DNA. Učinjeni su značajni napreci u identificiranju mutacija koje su povezane s pojavnošću bolesti u ljudi. Sljedeći važan napredak povezan je s projektom ljudskog genoma, s obzirom da je taj projekt otvorio nove mogućnosti za razvoj boljih molekularno-dijagnostičkih alata.

Razdoblje nakon objavljivanja slijeda nukleotida ljudskog genoma obilježeno je utjecajem epigenetike kao novog područja koje se bavi regulacijom genske ekspresije na transkripcijskoj razini koja nije u svezi s promjenama u slijedu DNA.

U današnje vrijeme govori se o novoj strategiji, teragnostici, koja objedinjuje bioinformatiku, genomiku, proteomiku i funkcionalnu genomiku kao molekularno-biološke alate za razvoj suvremene medicine, posebice molekularne dijagnostike i terapije.

e-pošta: kbarisic@pharma.hr

S05 – Molecular diagnostics

S05-1

Biology in clinical applications: from molecular diagnostics to theragnostics

Barišić K

Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Department of Medical Biochemistry and Haematology, Zagreb, Croatia

The development of molecular diagnostics could be divided into three phases: first, pre-human genome project era, second post-human genome project era and the last one which could be called era of theragnostics.

The first phase includes the impact of genetics to molecular diagnostics. Genetics has become an integral part of modern medicine since Watson and Crick described their structural model of DNA. Since 1953 a lot of advances have been made in identifying mutations associated with human diseases. Further advances, including Human Genome Project, are providing new opportunities to develop better diagnostics tools.

In post-human genome era, a new field with significant impact on modern medicine has arisen and termed epigenetics. Epigenetics refers to transcriptional control that regulates gene expression and is not related to changes in DNA sequence.

Recently, a new strategy called theragnostics, combines bioinformatics, genomics, proteomics, and functional genomics as molecular biology tools essential for development of modern medicine, particularly molecular diagnostics and therapeutics.

e-mail: kbarisic@pharma.hr

S05-2

Novi genomske pristupi u bolesnika s neurodegenerativnim bolestima

Borovečki F

Centar za funkcionalnu genomiku, Klinički bolnički centar Zagreb,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Ubrzani razvoj na području genomike, omogućen dostignućima Human Genome i HapMap projekata, otvorio je nebrojene mogućnosti u otkrivanju podležćih mehanizama važnih za održavanje funkcionalne homeostaze bioloških sustava. Nove genomske tehnologije omogućuju po prvi puta proučavanje interakcija tisuća gena istovremeno te otkrivanje kompleksnih mehanizama transkripcijske regulacije. Mutirani proteini, poput huntingtina i TBP-a, koji uzrokuju neurodegenerativne bolesti, ometaju bazalne i aktivirane transkripcijske mehanizme koji su prisutni u mnogim tkivima u tijelu. Štoviše, budući da su mutirani huntingtin i TBP eksprimirani u svim tkivima, uključujući i perifernu krv, za pretpostaviti je da uzorci ekspresijskog profila i regrutiranja promotora u krvi mogu u određenoj mjeri ukazati na patološke mehanizme prisutne u mozgu bolesnika. Kako bismo analizirali diferencijalno regrutiranje promotora u bolesnika sa spinocerebelarnom ataksijom 17 (SCA-17), izolirali smo periferne mononuklearne stanice iz krvi bolesnika, te smo proveli kromatinsku imunoprecipitaciju na čipu koristeći Affymetrix Human Promoter 1.0R i Agilent Human Promoter 244K genske čipove. Rezultati su pokazali povećanu regrutaciju promotora od strane mutiranog TBP-a na obje platforme, te su uključivali gene koji su pripadali funkcionalnim skupinama gena poput energetskog metabolizma, transkripcije, prijenosa signala i ubikvitin/proteasomskog sustava. Kako bismo odredili da li povećano vezivanje mutiranog TBP-a za promotore dovodi do promjena u transkripcijskoj aktivnosti, izolirali smo RNA iz periferne krvi bolesnika sa SCA-17, te smo proveli analizu pomoću Affymetrix Human Genome U133 2.0 PLUS genskih čipova. Ekspresijsko profiliranje pokazalo je da je većina diferencijalno eksprimiranih gena bila snižene ekspresije u bolesnika sa SCA-17, što ukazuje na mogući poremećaj transkripcije. Zaključno, mutirani proteini poput TBP-a, ometaju normalnu transkripcijsku aktivnost u stanicama periferne krvi, a opisane promjene mogu ukazati na patološke mehanizme uključene u neurodegenerativne bolesti.

e-pošta: fbor@mef.hr

S05-2

Novel genomic approaches in patients with neurodegenerative diseases

Borovečki F

Center for Functional Genomics, Clinical Hospital Center Zagreb, Zagreb
Medical School University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Rapid developments in the field of genomics, enabled by the Human Genome and HapMap projects, has opened numerous possibilities in discovery of biological mechanisms involved in functional homeostasis of biological systems. New genomic technologies have enabled for the first time investigation of thousands of genes at once, which has led to new insights into complex mechanisms of transcriptional regulation. Mutant proteins which cause neurodegenerative diseases, such as huntingtin or TBP, interfere with basal and activated transcriptional machinery suggesting that alterations in gene transcription may be detectable in many tissues. Moreover, since mutant huntingtin and TBP are expressed in all tissues, including peripheral blood, we hypothesized that gene expression and promoter recruitment patterns in blood could in part reflect pathological processes observed in the brain. In order to identify differential promoter recruitment in patients with spinocerebellar ataxia 17 (SCA-17), we isolated peripheral blood mononuclear cells and performed chromatin immunoprecipitation on chip using Affymetrix Human Promoter 1.0R and Agilent Human Promoter 244K microarrays. The results of the analysis showed increased promoter recruitment by the mutant TBP on both platforms, and included genes belonging to functional groups such as energy metabolism, transcription, signaling and ubiquitin/proteasome. In order to ascertain whether increased promoter binding by mutant TBP lead to changes in transcriptional activity, we also isolated RNA from peripheral blood of SCA-17 patients and performed microarray analysis using Affymetrix Human Genome U133 2.0 PLUS genechips. Expression profiling showed that majority of the differentially expressed genes were significantly down-regulated, indicating possible transcriptional disruption by the mutant protein. In conclusion, mutant proteins, such as TBP, interfere with normal transcriptional activity in peripheral blood cells and observed alterations may reflect pathological mechanisms involved in neurodegenerative diseases.

e-mail: fbor@mef.hr

S05-3

Genetsko testiranje monogenских bolesti

Canki-Klain N

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatski institut za istraživanje mozga i Klinika za neurologiju, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Genetsko testiranje predstavlja analizu specifičnog gena, njegovog produkta ili funkcije, a upotrebljava se kako bi se otkrile promjene koje su povezane s nasljednim bolestima. Rezultat genetskog testa može potvrditi ili isključiti sumnju na genetsku bolest ili pomaže da se odredi vjerojatnost da se u neke osobe pojavi genetski poremećaj ili da ga ona prenese na svoje potomstvo. Drugim riječima, genetski test može biti dijagnostički, presimptomatski, prenatalni ili test nositelja (autosomne recesivne ili X-vezane recesivne bolesti), odnosno neonatalni probir („screening“).

Kako genetsko testiranje nerijetko izaziva etičke i/ili psihološke probleme, često mu treba prethoditi genetsko savjetovanje i obaviještena privola. Uzorke za DNK analizu predstavlja bilo koji materijal koji sadrži jezgru (uobičajeno krv, koža, plodova voda, korionske resice). Proteinska analiza se radi iz najpristupačnijeg uzorka tkiva u kojem se genski produkt očituje (npr. mišić, koža, pokatkada limfoblastoidna stanična linija).

U osnovi postoje dva različita pristupa istraživanju DNK: 1) direktan ili ispitivanje gena, ukoliko je gen identificiran te 2) indirektan ili analiza genetskog povezivanja, ako je poznat smještaj gena na kromosomu, ali ne i njegova građa. Izbor analize određuje ispitivani gen, tj. njegova veličina, tip mutacije, ispitivana populacija, raspoloživost metoda itd. Analiza povezivanja ovisi o dostupnosti bliskih srodnika bolesnika, tipu obitelji (srodstvo), sigurnosti očinstva i genetskoj heterogenosti.

Izlaganje će biti ilustrirano analizama koje su bile učinjene u Laboratoriju za kliničku neurogenetiku i mišićne bolesti u Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

e-pošta: nina.canki-klain@zg.t-com.hr

S05-3

Genetic testing of single-gene disorders

Canki-Klain N

Zagreb University School of Medicine and Zagreb University Hospital Centre, Department of Neurology, Zagreb, Croatia

Genetic testing is the analysis of a specific gene, its product or function, or other DNA and chromosome analysis used to detect or exclude an alteration likely to be associated with a genetic disorder. In other words, the result of genetic test can confirm or rule out a suspected genetic condition or help determine a person's chance for developing or passing on a genetic disorder. Consequently, available types of testing include: diagnostic, presymptomatic, prenatal, carrier testing and newborn screening. Since genetic testing may open up ethical and or psychological problems it should be often accompanied by genetic counseling and informed consent. Samples for DNA testing can be any material containing cells with nucleus (usually blood, skin, amniotic fluid, chorionic villi). Protein analysis is done on a sample of tissue where the product of the gene is expressed (e.g. muscle, skin, sometimes lymphoblastoid cell line).

In principle, two different approaches to DNA analysis are available: 1) Direct or gene analysis if gene is identified, and 2) Indirect or linkage study if gene is located but still not known. The choice of analysis can vary according to the gene to be studied. It depends on how big the gene is, the type of mutation, studied population, availability of methods etc. Linkage analysis depends on availability of proband's DNA and his/her close relatives, family relationships, paternity must be clearly established and there should not (ideally) be genetic heterogeneity, that is, more than one disease locus for the clinical phenotype.

The presentation will be illustrated by analyses done in Laboratory of Clinical Neurogenetics and Muscular Disorders, Croatian Institute for Brain Research in Zagreb University School of Medicine.

e-mail: nina.canki-klain@zg.t-com.hr

S05-4

Molekularna dijagnostika poligeničkih bolesti

Sertić J

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskoga fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: Značajan je napredak ostvaren tijekom posljednjih 25 godina u genetici poligeničkih bolesti kao što su kardiocerebrovaskularne (uključujući hipertenziju, hiperlipidemiju, pretilost) i maligne bolesti. Mutacije koje često nastaju u nekim genima izravno su povezane s nedostacima u prijenosu lipida u plazmi i sklonosti prijevremenoj koronarnoj bolesti. Za čestu mutaciju u Apo CIII je u nekim slučajevima dokazano da je povezana s predispozicijom za preranu koronarnu bolest i infarkt miokarda. Za genske varijante drugog proteina u prijenosu lipida, apolipoproteina E, dokazano je da su povezane i s poremećajima prijenosa kolesterola u plazmi i razvojem prijevremene koronarne bolesti. Genetika ostalih multifaktorskih poremećaja (npr. dijabetes, venska tromboembolija, pretilost, Alzheimerova bolest) također je djelomično razjašnjena u ovom desetljeću i pružila je mnogo novih genskih biljega. No, ne postoji potpuno razumijevanje korelacije genskih varijanti s biološkim varijablama ili kliničkim procjenama, posebice kod zdravih ispitanika.

Pretilost je u ljudi multifaktorski sindrom na kojeg utječu genetički, ali i faktori okoline. Među genskim varijantama za koje je utvrđeno da su uključene u regulaciju tjelesne težine i razvoj pretilosti osobita je pozornost pridana polimorfizmima u genima povezanim s adipogenezom, potrošnjom energije, te inzulinskom rezistencijom. Peroksizomski proliferatorom aktivirani receptori (PPAR) su članovi podskupine jezgrenog hormonskog receptora o ligandima ovisnih transkripcijskih faktora. Izoforma PPAR-G2 je uglavnom izražena izražena u adipoznom tkivu gdje modulira izražaj ciljnih gena uključenih u diferencijaciju adipocita, osjetljivost na inzulin i upalne procese. Istražili smo povezanost nekih genskih polimorfizama PPARG2 (Pro12Ala); adiponektin (ADIPOQ -11391G>A i 11377C>G); IL-6 (-174G>C); TCF7L2 (rs7903146); eNOS (-786T>C), estrogeni receptor (ESR1alfa-TA); APOE; ACE (I/D); MTHFR (-677C>T); LPL (PvuII+/-) s kliničkim varijablama: spol, dob, indeks tjelesne mase (BMI) i biološkim varijablama: trigliceridi, kolesterol, HDL, LDL, CRP, homocistein, glukoza u 105 zdravih mladih ispitanika (raspon dobi 20-35 god.) hrvatskoga podrijetla.

Metode: Genotipizacija PPARG2, IL-6, ACE, LPL i eNOS provedena je primjenom PCR-RFLP, genotipizacija TCF7L2, APOE, MTHFR, ADIPOQ primjenom PCR u stvarnom vremenu, a genotipizacija ESR1alfa kapilarnom elektroforezom. Povezanost alela, genotipova i haplotipova s

S05-4

Molecular diagnosis of polygenic diseases

Sertić J

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of
Medicine and Clinical Hospital Center, Zagreb, Croatia

Background: During past twenty-five years major advances occurred in the genetics of polygenic disorders, such as cardiocerebrovascular (involving hypertension, hyperlipidemia, obesity) and malignant disease. The mutations that commonly occur in some genes have been directly related to defects of plasma lipid transport and predisposition to premature coronary artery disease. A common mutation in Apo CIII has in some cases been shown to associate with a predisposition to premature coronary artery disease and myocardial infarction. Genetic variants of another lipid transport protein, apolipoprotein E, have been shown to relate to both disorders of plasma cholesterol transport and the development of premature coronary artery disease. The genetics of other multifactorial disorders (e.g. diabetes mellitus, venous thromboembolism, obesity, Alzheimer's disease) has also been partially clarified in the present decade, and has provided an abundance of new genetic markers.

The correlation of gene variants with biological variables or clinical assessments has not been well understood, especially among apparently healthy subjects.

Human obesity is a multifactorial syndrome influenced by both environmental and genetic factors. Among gene variants found to be involved in body weight regulation and the development of obesity, particular attention has been paid to polymorphisms in the genes related to adipogenesis, energy expenditure, and insulin resistance. Peroxisome proliferator-activated receptors PPARs are members of the nuclear hormone receptor subfamily of ligand-dependent transcription factors. The isoform PPARG2 is mainly expressed in adipose tissue where it modulates the expression of target genes involved in adipocyte differentiation, insulin sensitivity and inflammatory processes. We explored the association of some genetic polymorphisms of: PPARG2 (Pro12Ala); adiponectin (ADIPOQ -11391G>A and 11377C>G); IL-6 (-174G>C); TCF7L2 (rs7903146); eNOS (-786T>C); estrogen receptor (ESR1alfa-TA); APOE; ACE (I/D); MTHFR (-677C>T); LPL (PvuII+/-), with clinical variables: gender, age, BMI, and biological variables: triglycerides, cholesterol, HDL, LDL, CRP, homocysteine, glucose in 105 healthy young subjects (age range 20-35 yrs) of Croatian origin.

Methods: The genotyping of PPARG2, IL-6, ACE, LPL, eNOS was performed by PCR-RFLP, TCF7L2, APOE, MTHFR, ADIPOQ, by real-time PCR and ESR1alpha by capilla-

biološkim varijablama provedena je primjenom UNPHASED-3.0.10. Spol, dob i BMI korišteni su kao kovarijable.

Rezultati: BMI je bio povišen ($> 25 \text{ kg/m}^2$) u 22% ispitanika. Povišene koncentracije kolesterola ($> 5,0 \text{ mmol/L}$) nađene su u 23% ispitanika, LDL ($> 3,0 \text{ mmol/L}$) u 23%, triglicerida ($> 1,7 \text{ mmol/L}$) u 11% ispitanika. Utvrdili smo statistički značajne razlike u težini ispitanika ($P = 0,015$), BMI ($P = 0,023$), te omjeru struka i bokova ($P = 0,015$) s obzirom na vrstu prehrane: ispitanici na mediteranskoj prehrani imali su najniže vrijednosti u usporedbi s ispitanicima na kontinentalnoj ili miješanoj prehrani. Značajne su povezanosti nađene za: gensku polimorfnu varijantu LPL i abdominalnu pretilost ($P = 0,018$), varijantu APOE4 i hiperkolesterolemiju ($P = 0,002$) te ESR1-L alel i hiperkolesterolemiju ($P = 0,023$). U našoj studiji do sada nismo našli povezanosti drugih genskih varijanti s biološkim varijablama.

Zaključci: Genske polimorfne varijante ESR1, LPL i APO E mogli bi predstavljati prediktivne genske rizične biljege za lipidni status i pretilost u mladih zdravih ispitanika. Mediteranska prehrana je također važan pozitivni faktor u abdominalnoj pretilosti.

e-pošta: jadranka.sertic@kbc-zagreb.hr

ry electrophoresis. Associations of alleles, genotypes and haplotypes with biological variables were performed using UNPHASED-3.0.10. Sex, age, BMI was used as covariates.

Results: BMI was increased ($> 25 \text{ kg/m}^2$) in 22% of subjects. Increased cholesterol values ($> 5.0 \text{ mmol/L}$) were found in 23% of subjects, LDL ($> 3.0 \text{ mmol/L}$) in 23%, triglycerides ($> 1.7 \text{ mmol/L}$) in 11% of subjects. We found statistically significant differences in subjects' weight ($P = 0.015$), BMI ($P = 0.023$), and hip/waist ratio ($P = 0.015$) in regard to their diet type; subjects with Mediterranean diet had the lowest values compared to those on continental and mixed diet. Significant associations were found for: LPL genetic polymorphic variant and abdominal obesity ($P = 0.018$), APOE4 variant and hypercholesterolemia ($P = 0.002$), and ESR1-L allele and hypercholesterolemia ($P = 0.023$). No association of other genetic variants with biological variable has been found so far in our study.

Conclusions: ESR1, LPL, and APO E genetic polymorphic variants could represent predictive genetic risk markers for lipid status and obesity in young healthy subjects. Mediterranean type of diet is also an important positive factor in abdominal obesity.

e-mail: jadranka.sertic@kbc-zagreb.hr

S05-5

Molekularna HLA-DNA tipizacija

Grahovac B

Laboratorij za molekularnu dijagnostiku, Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka

Humani sustav tkivne snošljivosti (HLA), ekvivalent glavnog sustava tkivne snošljivosti (MHC), nalazi se na kratkom kraku kromosoma 6 (6p21.3). HLA geni obuhvaćaju skupinu od više od 200 lokusa koji kodiraju membranske proteine čija je funkcija da vežu peptidne antigene i predstavljaju ih T-staničnim receptorima na CD8 (HLA razred I) ili CD4 (HLA razred II) limfocitima podrijetlom iz timusa. Funkcionalni HLA geni su izrazito polimorfni i varijabilnost je koncentrirana na specifičnim mjestima, u tzv. regijama vezanja peptida, koje su smještene u eksonima 2 i 3 (geni I razreda) i eksonu 2 (geni II razreda). Zbog njihovog kliničkog značaja (mehanizam kako HLA polimorfizam utječe na odbacivanje stranog tkiva, kako su pojedini aleli i haplotipovi udruženi s progresijom infektivnih bolesti, podložnost autoimunim bolestima i ostalim kroničnim ne-infektivnim bolestima) prikupljeno je mnoštvo podataka o HLA. Najnoviji podaci, zaključno s travnjem 2009. godine, izvještavaju o 3.528 različitih alela na lokusima HLA sustava.

S05-5

Molecular HLA-DNA typing

Grahovac B

Clinical Institute of Laboratory Diagnostic, Department of pathology, School of Medicine and Clinical Hospital Center Rijeka, University of Rijeka, Rijeka, Croatia

The Human Leukocyte Antigen (HLA) region is the human equivalent of the Major Histocompatibility Complex (MHC) located on the short arm of chromosome 6 (6p21.3). HLA genes comprise a cluster of more than 200 loci encoding integral membrane proteins that bind antigenic peptides and present them to the T-cell receptors of either the CD8 (class I HLA molecules) or CD4 (class II HLA molecules) thymus-derived lymphocytes. The functional HLA genes are highly polymorphic and most of the variability is concentrated at specific sites (the peptide-binding region) in exons 2 and 3 (class I genes) or exon 2 only (class II genes). Because of its clinical significance (the mechanism how HLA polymorphisms influence foreign tissue to be rejected by the host and by which certain alleles and haplotypes are associated with progression to infectious diseases and susceptibility to a wide range of autoimmune and other chronic, non-infectious diseases), large sets of HLA population data have been accumulated. Nucleotide sequences for more than 3,528

Tijekom godina koristile su se različite metode za tipizaciju HLA proteina. Dugo godina HLA polimorfizam je bio određivan isključivo serološkim metodama, temeljeći se na reaktivnosti seruma na HLA antigene. Pojavom rekombinantne DNA tehnologije pojavila se mogućnost direktnog dokazivanja genetičkih razlika između HLA lokusa. Danas je kliničkim laboratorijima na raspolaganju nekoliko različitih metoda za HLA DNA tipizaciju. Uglavnom su to hibridizacijske ili alel-specifične metode. Hibridizacijskim metodama određuju se HLA aleli umnožavanjem specifične regije gena generičkim početnicama i naknadno se vrši hibridizacija PCR amplikona s alel-specifičnim oligonukleotidnim probama. Alel-specifična metoda koristi niz parova početnica koji su specifični za pojedini alel i tipizacija se provodi direktnim PCR umnožavanjem DNA. Svaka metoda ima svoje prednosti i nedostatke. Pojedini laboratoriji moraju prepoznati koji su tipovi testova za njih najprimjereniji, vodeći računa o cijeni testa, vremenu potrebnom za testiranja, potrebnu razlučivost tipizacije, ukupan broj testova po danu. Za laboratorije kojima je dostupna metoda sekvenciranja sigurno je to metoda izbora, zbog svoje osjetljivosti, specifičnosti i cijene, a osobito zbog mogućnosti da se za svaki alel odredi njegova kompletna nukleotidna struktura.

e-pošta: blazenka.grahovac@medri.hr

different alleles of these genes have been determined by April 2009.

A variety of techniques have been applied for HLA tissue typing. For many years, HLA polymorphisms were typed by serological responses to HLA antigens. However, the advent of recombinant DNA technology has revealed identification of genetic differences among the HLA loci directly. Today, clinical laboratories use several different types of HLA DNA typing methods. In general, HLA DNA can be typed either by hybridizing labeled, sequence – specific oligonucleotide probes to HLA loci amplified with generic primers by the polymerase chain reaction (PCR), or by using allele specific primers for PCR amplification directly to detect HLA polymorphisms. Each HLA DNA typing technique has its specific features, and clinical laboratory personnel must choose the most appropriate test for their needs based on cost, average turnaround time, required resolution, and number of average samples per day. For those laboratories with access to sequencing technology, it may be the most sensitive, specific and cost-effective option to sequence certain HLA loci directly.

e-mail: blazenka.grahovac@medri.hr

S06 – Prijeanalitička i poslijeanalitička faza laboratorijske dijagnostike

S06-1

Indikatori kvalitete

Šimundić AM

Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Načelo cjelovitog pristupa upravljanju kvalitetom podrazumijeva specifičan ustroj laboratorija koji teži pružati usluge i proizvode u potpunosti zadovoljavajući potrebe svojih korisnika: bolesnika i kliničkog osoblja. Jedna od ključnih postavki cjelovitog pristupa upravljanju kvalitetom je svakako i neprekidno poboljšavanje temeljem pokazatelja koji proizlaze iz mjerenja svih ključnih procesa i aktivnosti. Ti se pokazatelji nazivaju indikatorima kvalitete i definiramo ih kao mjerljive, objektivne, brojčane pokazatelje djelotvornosti ključnih segmenata nekog sustava. Uvođenje i kontinuirano praćenje indikatora kvalitete obveza je svih laboratorija akreditiranih po normi EN ISO 15189 i njima je moguće pratiti ključne, strateške

S06 – Pre-analytical and post-analytical phases of the laboratory diagnostics

S06-1

Quality indicators

Šimundić AM

University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Total Quality Management is a specific approach to the management in a laboratory that aims to provide products and services that fully meet the needs of the both patients and clinical staff. The key prerequisite to the successful implementing TQM is a continuous system improvement based on the indicators of key processes and activities. Those indicators are called quality indicators and are defined as measurable, objective, quantitative measures of key system elements performance. To systematically monitor and evaluate quality indicators of the system is a must for each ISO15189 accredited clinical laboratory. Quality indicators may be used to measure the

i pomoćne procese u medicinskom laboratoriju. Pri tome valja istaknuti kako je bitno da indikatori kvalitete ključnih procesa pokrivaju sve tri faze rada u laboratoriju: predanalitičku, analitičku i poslijeanalitičku. Indikatori kvalitete služe za vlastitu samoprocjenu te za međulaboratorijsku usporedbu. Kako se najviše pogrešaka događa u predanalitičkoj fazi, taj je dio laboratorijske djelatnosti ujedno i segment sustava s najvećim potencijalom za poboljšanje. U novije vrijeme se uz već dobro poznate programe vanjske procjene analitičke kvalitete, pojavljuju i programi koji omogućuju i vanjsku procjenu predanalitičkog i dijela poslijeanalitičkog procesa. Takvi programi obuhvaćaju pitanja identifikacije bolesnika, kvalitete i prihvatljivosti uzorka, TAT, izvještavanje o kritičnim vrijednostima, ispravljanje i opozvane nalaze, pogreške zadavanje pretraga i neka druga. Uz te programe postoje i programi vanjske procjene kvalitete koji pokrivaju poslijeanalitički dio i uglavnom se odnose na procjenu kvalitete interpretacije laboratorijskih nalaza. Harmonizacija postupaka u izvananalitičkom segmentu potrebna je na nacionalnoj i međunarodnoj razini, jer ona predstavlja važan doprinos kvaliteti laboratorijske djelatnosti i skrbi za bolesnika.

e-pošta: am.simundic@gmail.com

S06-2

Programi vanjske procjene kvalitete rada poslijeanalitičke faze

Challand G

Bolnica Royal Berkshire, Zavod za kliničku biokemiju, Reading, Berkshire, Ujedinjeno Kraljevstvo

Procjenjuje se da pogreške u poslijeanalitičkoj fazi laboratorijske medicine, posebno kod neispravnog tumačenja nalaza laboratorijskih pretraga čine barem 20% svih pogrešaka koje se pripisuju stručnom osoblju laboratorija. No, sve je veća potreba za laboratorijskim stručnjacima koji mogu pružiti savjete o tumačenju rezultata, što obično čine dodavanjem kratkih napomena na nalazu. Iznenadjuće je koliko je malo podataka temeljenih na dokazima dostupno za tumačenje rezultata laboratorijskih pretraga. Svaka je takva napomena različita i procjena tumačenja nije jednostavna. Mogu se koristiti različiti pristupi: procjena cijele napomene ili samo nekih njenih sastavnica; te sudjelovanje nezavisnog procjenitelja ili skupine stručnjaka. Niti jedan se pristup ne može smatrati zlatnim standardom, budući da procjena predstavlja nesavršenu znanost te je kao takva samo smjernica, a ne definicija jedinstvenih rješenja. Programi vanjske procjene kvalitete

quality of the key, strategic and support processes. It is important that all three key processes in the laboratory (preanalytical, analytical and postanalytical) are addressed. Besides for self-evaluation, quality indicators are also used for benchmarking. Since most errors occur in the preanalytical phase it is the segment having major potential for improvement. Besides well established proficiency testing for the external independent evaluation of analytical phase of laboratory processes, some preanalytical and postanalytical external quality assurance programs have also emerged. Such programs cover the issues of patient identification, sample quality and appropriateness, TAT, critical values reporting, corrected and withdrawn reports, test request errors and some other. External quality assurance programs for postanalytical phase have also been introduced and mostly relate to the quality of interpretative comments. Harmonizing the extraanalytical phase of laboratory diagnostics is essential to the national as well as to the international level, since it represents the major contribution to the quality of the laboratory testing process and the patient care.

e-mail: am.simundic@gmail.com

S06-2

External quality assurance for the post-analytical phase

Challand G

Royal Berkshire Hospital, Clinical Biochemistry Department, Reading, Berkshire, United Kingdom

Errors in the post-analytical phase of laboratory medicine, particularly in incorrect interpretation of laboratory results, have been estimated to be at least 20% of all errors ascribable to laboratory professional staff. But there is a growing need for laboratory professionals to offer advice on the interpretation of results, typically by adding a brief interpretative comment to a report. Surprisingly little evidence-base data exists to support interpretation of laboratory test results, and interpretative comments accompanying laboratory reports are complex, usually consisting of several components which may suggest possible diagnoses and additional investigations. Every comment is different, and assessment of interpretation is difficult. Different approaches can be used: assessing whole comments or components of comments; and using independent assessors or a pooled panel of experts.

(engl. *External Quality Assurance Schemes*, EQAS) ispituju tumačenje rezultata te na taj način pružaju sudionicima programa informaciju o tome kakve su njihove napomene u usporedbi s drugima, primarna je svrha tih programa ipak obrazovna te takvi programi pomažu u prikupljanju spoznaja o tome kako poboljšati i razviti tumačenje. Takav je program u Ujedinjenom Kraljevstvu započeo 2001. dokazuje da se sudjelovanjem u njemu poboljšava laboratorijska praksa.

e-pošta: gqn62@dial.pipex.com

No approach can be considered to be a “gold standard” since assessment is an imperfect science and is a guide to, not a definition of unequivocal solutions. External Quality Assurance Schemes examining interpretation can provide information to individual participants on how their comments compare with others, but their primary purpose is educational and such Schemes enable us to gather knowledge on how to better establish and develop interpretation. The UK Scheme started in 2001, and provides strong evidence that participation in such Schemes improves laboratory practice.

e-mail: gqn62@dial.pipex.com

S06-3

Kako upravljati nesukladnim uzorcima?

Perkov S

Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

Sustavna kontrola cjelokupnog analitičkog procesa uz kontinuirano praćenje i upravljanje nesukladnostima obaveza je svih medicinskih laboratorija akreditiranih prema normi ISO 15189: 2003. Iako su prijeanalitički standardi kvalitete dobro definirani na međunarodnoj i nacionalnoj razini, najviše nesukladnosti događa se u prijeanalitičkoj fazi. Nesukladni uzorci usljed krive identifikacije, količine (nedovoljan volumen uzorka za analizu, neodgovarajući omjer krvi i antikoagulansa) ili kvalitete (hemolizirani, zgrušani, kontaminirani uzorci ili uzorci sakupljeni u krivi spremnik) vodeći su prijeanalitički problemi.

S ciljem promocije, standardizacije i harmonizacije upravljanja nesukladnim uzorcima u kliničkim laboratorijima 2007. godine. Radna grupa za izvananalitičku varijabilnost (engl. *Study Group on Extra-analytical Variability*) u koju su okupljeni predstavnici Talijanskog društva za kliničku biokemiju i kliničku molekularnu biologiju (engl. *Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology*, SIBioC), Talijanskog društva za laboratorijsku medicinu (engl. *Italian Society of Laboratory Medicine*, SIMeL) i Talijanskog odbora za standardizaciju hematoloških i laboratorijskih metoda (engl. *Italian Committee for Standardization of Hematological and Laboratory Methods*, CISMEL) donijela je niz preporuka koje se odnose na edukaciju i odgovornost osoblja, primjenu objektivnih i standardiziranih kriterija i postupaka za detekciju nesukladnih uzoraka, te upravljanje nesukladnim uzorcima.

Edukacija zdravstvenog osoblja uključenog u procese sakupljanja, rukovanja, pripreme i prijenosa uzoraka je ključna za razumijevanje utjecaja prijeanalitičkih čimbenika na

S06-3

How to manage unsuitable specimens?

Perkov S

Institute of Clinical Chemistry, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

Systematic control of the total analytical process with continuous monitoring and management of non-conformities is the obligation of all medical laboratories accredited according to ISO 15189: 2003. Although preanalytical quality standards are well defined at international and national level, the most errors in laboratory medicine occur in the preanalytical phase. Unsuitable samples due to misidentification, quantity (insufficient volume to perform the analysis, inadequate blood /anticoagulant ratio) or quality issues (hemolytic, clotted, contaminated specimens, or samples collected in the wrong container) represent the leading preanalytical problem.

In 2007, the Study Group on Extra-analytical Variability convened by representatives of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC), Italian Society of Laboratory Medicine (SIMeL) and Italian Committee for Standardization of Hematological and Laboratory Methods (CISMEL) have proposed a series of recommendations to promote, standardize and harmonize management of unsuitable samples in clinical laboratories. These recommendations include staff education and responsibility, the implementation of objective and standardized criteria and procedures for detecting unsuitable samples and management of unsuitable samples.

Education of health workers involved in the processes of collecting, handling, preparation and transport of samples is crucial for understanding the impact of preanalytical factors on the quality of the sample. Since standardized preanalytical procedures can reduce the impact of short-term biological and methodological factors, the in-

kvalitetu uzorka. Obzirom da se standardizacijom prijeanalitičkih postupaka može značajno smanjiti utjecaj kratkotrajnih bioloških i metodoloških čimbenika, upute za sakupljanje, rukovanje i prijenos uzoraka moraju biti jasne, lako razumljive i dostupne svim osobama koje se uključene u prijeanalitičke procese, kako unutar tako i izvan kliničkog laboratorija. Za učinkovitu primjenu navedenih postupaka nužno je osigurati kontinuiranu komunikaciju i suradnju između svih članova zdravstvenog tima.

Hemoliza, lipemija i ikterija su čimbenici koji najviše utječu na kvalitetu uzorka. Intenzitet interferencije ovisi o pretrazi i o metodi. Primjena tehnologija koje mogu automatski detektirati i po potrebi ispraviti širok spektar analitičkih interferencija, uključujući hemolizu, lipemiju, ikteriju, kao i nedovoljan ili zgrušan uzorak se preporuča, osobito zbog činjenice da se na taj način prevladava subjektivnost vizualne procjene, povećava osjetljivost u detekciji nesukladnog uzorka i harmonizira ponašanje uključenog osoblja.

Laboratorij treba u svojim postupcima jasno specificirati vrstu nesukladnih uzoraka i postupke za njihovu identifikaciju, vrste pretraga na koje može utjecati prisustvo neke interferencije i primjenjena rješenja za upravljanje utvrđenim nesukladnostima. Pri tome treba slijediti i primjenjivati znanja za postupanje s hemoliziranim uzorcima i upute za neprihvatanje uzoraka, koje je na našoj nacionalnoj razini definiralo Povjerenstvo za stručna pitanja Hrvatske komore medicinskih biokemičara (www.hkmb.hr). Poseban problem u upravljanju nesukladnim uzorcima predstavljaju neodgovarajuće označeni uzorci. Iako je njihova zastupljenost u odnosu na ostale nesukladne uzorke minorna, posljedice koje mogu nastati zbog krivih ili nepotrebnih dijagnostičkih i terapijskih postupka mogu biti vrlo teške.

U skladu sa standardima dobre stručne prakse (www.hkmb.hr), svaki laboratorij treba razviti vlastitu strategiju za prepoznavanje, detekciju i praćenje nesukladnih uzoraka. Primjena međunarodnih preporuka uz kontinuirano praćenje nesukladnih uzoraka i analizu čimbenika koji su doveli do neprihvatanja uzoraka, te pokretanje odgovarajućih popravni radnji, osigurat će smanjenje prijeanalitičkih pogrešaka i kontinuirano poboljšanje kvalitete cjelokupnog analitičkog procesa.

e-pošta: sonja.perkov@hdmb.hr

Instructions for collecting, handling and transport of samples must be clear, easily intelligible and available to all healthcare operators involved in preanalytical processes, both within and outside the clinical laboratory. For effective implementation of the above procedures, it is necessary to ensure continuous communication and cooperation between all members of the health team.

Hemolysis, lipemia, and icterus are factors that mostly affect the quality of the sample. Intensity of the interference depends on the method and the analyte. Application of technology that can automatically detect and if necessary correct a wide range of analytical interference, including hemolysis, lipemia, and icterus, as well as insufficient or clotted specimens is recommended, since this would help to overcome the subjectivity of visual inspection, increasing sensitivity in the detection of unsuitable samples and harmonizing behavior of engaged health staff.

The laboratory should clearly specify within its operation procedures the type of unsuitable specimens and the procedures adopted for their identification, the type of the analyses that may be influenced by the presence of a given interfering substance and applied solutions for the management of identified non-conformities. Procedures for hemolyzed samples handling and instructions for rejection of the samples, which are defined at the national level by the Commission for technical questions of the Croatian Chamber of Medical Biochemists (www.hkmb.hr) must be followed.

Special problem in management of unsuitable samples are inadequately labeled samples. Although their representation is minimal in relation to other unsuitable samples, consequences that may arise due to wrong or unnecessary diagnostic and therapeutic procedure can be very difficult.

According to the standards of good laboratory practice (www.hkmb.hr), each laboratory should develop its own strategy for identification, detection and monitoring of unsuitable samples. Implementation of international recommendations with the continuous monitoring of unsuitable specimens and analysis of factors associated with rejection, and start of the appropriate correctional action, can reduce errors and promote continuous quality improvement of the whole analytical process.

e-mail: sonja.perkov@hdmb.hr

S06-4

Nadzor izvananalitičke faze laboratorijske dijagnostike - Europska perspektiva

Bilić-Zulle L^{1,2}, Šimundić AM³, Nikolac N³, Šupak Smolčić V¹, Honović L⁴

¹Zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Rijeka, Rijeka

²Katedra za medicinsku informatiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

³Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

⁴Medicinsko biokemijski laboratorij, Opća bolnica Pula, Pula

Uvod: Analitička kontrola kvalitete najbolje je kontrolirana i standardizirana faza laboratorijskog rada, međutim izvananalitička faza dio je laboratorijskog rada koji može biti izvor značajnih pogrešaka, a za koji je sustav kontrole kvalitete u razvoju. Cilj rada jest procijeniti postupke izvananalitičke faze laboratorijskog rada u europskim laboratorijima.

Ispitanici i postupci: S pomoću anonimnog upitnika prikupljeni su podatci o osoblju neposredno uključenom u laboratorijski tehnički rad i s pomoću 20 pitanja zatvorenog tipa ispitana je učestalost pojedinih postupaka izvananalitičke faze laboratorijske dijagnostike uz prekodiranje negativnih pitanja (prema četiri stupanjskoj Likertovoj ljestvici: nikad = 1, rijetko = 2, često = 3 i uvijek = 4, te oznaka x ukoliko ispitanik ne radi na radnom mjestu koje obuhvaća opisani postupak). Odgovori na pitanja izraženi su prosječnom ocjenom 1,0-4,0. Pitanja su podijeljena u tri skupine: kriteriji prihvatljivosti uzorka (N = 6), postupci vađenja krvi (N = 6), izvještavanje nalaza (N = 7) te pitanje o bilježenju nesukladnosti u radu. U istraživanju je sudjelovalo 460 ispitanika (iz obrade isključeno je 17 nevažećih upitnika) iz 12 laboratorija u 10 zemalja (iz Hrvatske tri laboratorija i po jedan iz Bosne i Hercegovine, Češke, Mađarske, Meksika, Poljske, Portugala, Rumunjske, Srbije i Ukrajine). Prikupljeni su sljedeći podatci o laboratorijima koji su sudjelovali: područje rada, status akreditacije, struktura osoblja, stupanj informatizacije, te postojanje pisanih standarda za različite postupke izvananalitičke faze. Prosječna dob ispitanika iznosi medijan (raspon) 42 (20-75) godina, 93% žena; 43% ispitanika je srednje stručne spreme, 35% više i 22% visoke; 84% ispitanika je zdravstvene i 16% ostalih struka. Vlastitu informatičku pismenost 29% ispitanika ocjenjuje dobrom, 62% srednjom i 9% lošom.

Rezultati: Prosječna ocjena odgovora na sva pitanja u svih ispitanika iznosi $X \pm SD = 3,1 \pm 0,3$. Nije pronađena razlika u prosječnoj ocjeni s obzirom na zdravstvenu i ostale struke, kao niti s obzirom na stručnu spremu i infor-

S06-4

Control of extra-analytical phase of the laboratory diagnostics – European perspective

Bilić-Zulle L^{1,2}, Šimundić AM³, Nikolac N³, Šupak Smolčić V¹, Honović L⁴

¹Department of Laboratory Diagnostics, Rijeka Clinical Hospital Centre, Rijeka, Croatia

²Department of medical informatics, Rijeka University School of Medicine, Rijeka, Croatia

³University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

⁴Laboratory of Clinical Chemistry, Pula General Hospital, Pula, Croatia

Background: Quality control of analytical phase of laboratory diagnostics is well established and standardized procedure. However, extra-analytical phase can be source of significant mistakes and its quality control is still developing and it is not widely applied. Aim of the study is to evaluate procedures of extra-analytical phase of laboratory diagnostics in European laboratories.

Subjects and methods: The results were collected from laboratory personnel using anonymous questionnaire with 20 Likert scaled questions to test frequency (never = 1, rarely = 2, often = 3, always = 4 and sign x if subject was not involved in described procedure) of representative procedures of extra-analytical phase with recoding of negative questions. Answers were expressed as average grade 1.0 - 4.0. There were three groups of questions: criteria of acceptance of sample (N = 6), procedures of phlebotomy (N = 6), reporting of results (N = 7) and one separate question about recording of nonconformities in work. The questionnaire was completed by 460 subjects (17 excluded from data analysis) from 12 laboratories from 10 countries (3 laboratories from Croatia and one from each of following countries: Bosnia and Herzegovina, Czech Republic, Hungary, Mexico, Poland, Portugal, Romania, Serbia and Ukraine). Data collected on laboratories were: diagnostics services, accreditation status, personnel structure, status of laboratory information system, and existence of written and accessible procedures for extra-analytical phase. Subjects' median age was 42 ranged from 20 to 75 years; 93% of women; 43% high school graduated, 35% with college degree (B.Sc) and 22% university graduated. Computer skills were self-estimated as good by 29%, intermediate by 62% and poor by 9% of subjects.

Results: Average grade of all answers in whole subject group was $X \pm SD = 3.1 \pm 0.3$. There is no difference in average grade regarding to subjects' professional qualification, primary profession (health or other) or computer skills. There is no correlation between average grade

matičku pismenost. Nema korelacije između prosječne ocjene i dobi ispitanika. Nesukladnosti u radu nikad i rijetko bilježi 30%, a često i uvijek 70% ispitanika. Postoji statistički značajna razlika među prosječnim ocjenama svih triju skupina pitanja, o kriterijima prihvatljivosti uzorka, o postupcima vađenja krvi i izvještavanju nalaza $3,1 \pm 0,6$ vs. $2,8 \pm 0,6$ vs. $3,3 \pm 0,5$ ($P < 0,001$). Statistički značajna razlika ($P < 0,001$) u prosječnoj ocjeni svih pitanja postoji između ispitanicima iz laboratorija bez akreditacije ($3,0 \pm 0,3$; $N = 272$) i laboratorija koji su akreditirani ($3,3 \pm 0,2$; $N = 108$) ili u pripremi za akreditaciju ($3,2 \pm 0,3$; $N = 63$), koji se međusobno ne razlikuju. Ispitanici u laboratorijima koji sudjeluju u vanjskoj kontroli kvalitete izvananalitičke faze iskazali su značajno višu prosječnu ocjenu svih pitanja ($3,2 \pm 0,3$; $N = 129$) od ispitanika u laboratorijima koji u nju ne sudjeluju ($3,1 \pm 0,4$; $N = 314$); $P = 0,025$.

Zaključci: Nadzor izvananalitičke faze laboratorijskog rada nužan je korak ka postizanju visokih standarda dobre laboratorijske prakse. Najosjetljiviji dio izvananalitičke faze jest uzorkovanje krvi u za koji je potrebna dodatna izobrazba te isticanje važnosti visoke kvalitete. Izvananalitička faza zahtjeva dodatnu izobrazbu i kontrolu, a provođenjem postupaka akreditacije te uvođenjem vanjske kontrole izvananalitičke faze značajno se povećava kvaliteta izvananalitičkih postupaka.

e-pošta: lidija.bilic-zulle@medri.hr

and age of subjects. Nonconformities are never or rarely documented by 30% of subjects while 70% do it often or always. There is statistically significant difference between average grade of three groups of questions: criteria of acceptance of sample, procedures of phlebotomy and reporting of results 3.1 ± 0.6 vs. 2.8 ± 0.6 vs. 3.3 ± 0.5 ($P < 0.001$). Statistically significant difference ($P < 0.001$) was revealed between subjects from laboratories that are not accredited (3.0 ± 0.3 , $N = 272$) and from those laboratories that are in preparation for accreditation (3.2 ± 0.3 , $N = 63$) or already accredited (3.3 ± 0.2 , $N = 108$). Subjects from laboratories that participate in some form of external quality control for extra-analytical phase of laboratory diagnostics have higher average grade (3.2 ± 0.3 , $N = 129$) than those from laboratories that do not participate in such QC programs (3.1 ± 0.4 ; $N = 314$); $P = 0.025$.

Conclusions: Quality control of extra-analytical phase of laboratory diagnostics is mandatory in process of establishing high standards of good laboratory practice. The weakest part of extra-analytical phase is sample collection e.g. phlebotomy procedures. That part so as all procedures of extra-analytical phase needs more education, quality control and emphasizing the importance of high quality of such procedures. External quality control for extra-analytical phase and accreditation procedures significantly raise the quality of extra-analytical procedures.

e-mail: lidija.bilic-zulle@medri.hr

S06-5

Nadzor izvananalitičke faze laboratorijske dijagnostike-stanje u Hrvatskoj

Honović L¹, Šimundić AM², Bilić-Zulle L^{3,4}, Nikolac N², Šupak Smolčić V³

¹Medicinsko biokemijski laboratorij, Opća bolnica Pula, Pula

²Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

³Zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Rijeka, Rijeka

⁴Katedra za medicinsku informatiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

Uvod: Nadzor izvananalitičke faze laboratorijske dijagnostike zastupljen je dijelom u standardima stručnog nadzora Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB). Cilj rada bio je utvrditi svakodnevnu primjenu najznačajnijih postupaka i standarda izvananalitičke faze laboratorijske dijagnostike na području naše države.

Postupci i ispitanici: S pomoću anonimnog upitnika prikupljeni su podatci o članovima HKMB i s pomoću 20 pi-

S06-5

Control of pre-analytical phase of the laboratory diagnostics-results of Croatian survey

Honović L¹, Šimundić AM², Bilić-Zulle L^{3,4}, Nikolac N², Šupak Smolčić V³

¹Laboratory of Clinical Chemistry, Pula General hospital, Pula

²University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

³Department of Laboratory Diagnostics, Rijeka Clinical Hospital Centre, Rijeka, Croatia

⁴Department of medical informatics, Rijeka University School of Medicine, Rijeka, Croatia

Introduction: Control of pre-analytical phase of the laboratory diagnostics is partly represented by expert controls of Croatian Chamber of Clinical Chemistry. The aim of the study presented was to determine everyday use of the most important procedures and standards of pre-analytical phase of the laboratory diagnostics in Croatia.

Materials and methods: The results were collected from members of Croatian Chamber of Clinical Chemistry usi-

tanja zatvorenog tipa ispitana je učestalost (nikad = 1, rijetko = 2, često = 3 i uvijek = 4) pojedinih postupaka izvananalitičke faze laboratorijske dijagnostike uz prekodiranje negativnih pitanja. Odgovori na pitanja izražavaju se prosječnom ocjenom 1,0-4,0. Pitanja su podijeljena u tri skupine: kriteriji prihvatljivosti uzorka (6 pitanja), postupci vađenja krvi (6 pitanja), izvještavanje nalaza (7 pitanja) i izdvojeno je pitanje o bilježenju nesukladnosti u radu. Na upitnik je odgovorilo 144 ispitanika (27% aktivnih članova HKMB) prosječne dobi medijan (interkvartilni raspon) = 47 (26-65) godina, 93% žena. Ispitanici su 57% diplomirani inženjeri medicinske biokemije, 40% specijalisti i 3% docenti i profesori. Farmaceutsko-biokemijski fakultet je završilo 96% ispitanika, 62% je dobre informatičke pismenosti. U laboratorijima primarne zdravstvene zaštite (PZZ) radi 40% ispitanika, 15% u laboratorijima općih bolnica, 13% u specijalističkim bolnicama, 12% u kliničkim bolnicama, 13% u kliničkim bolničkim centrima te 7% u privatnim laboratorijima.

Rezultati: Prosječna ocjena odgovora na sva pitanja u svih ispitanika iznosi $X \pm SD = 3,1 \pm 0,4$. Nema statistički značajne razlike s obzirom na vrstu ustanove, stupanj usavršavanja i informatičku pismenost, dok razlika s obzirom na spol i završen fakultet nije ispitana zbog izrazite nejednolikosti raspodjele. Nema povezanosti prosječne ocjene i dobi ispitanika. Postoji statistički značajna razlika između prosječne ocjene sve tri skupine pitanja, prihvatljivosti uzorka $3,3 \pm 0,5$ vs. postupci vađenja krvi $2,8 \pm 0,5$ vs. izvještavanje nalaza $3,2 \pm 0,5$ ($P < 0,001$). Nesukladnosti u radu nikad i rijetko bilježi 21%, a često i uvijek 79% ispitanika.

Zaključci: Iako bi se prosječna ocjena 3,1 mogla bi se smatrati visokom, najniža ocjena faze vađenja krvi pokazuje potrebu za dodatnom izobrazbom i kontrolom kako ovog segmenta tako i cijele izvananalitičke faze.

e-pošta: lhonovic@obpula.hr

S07 – Transplantacija

S07-1

Krv pupkovine kao izvor matičnih stanica

Golubić-Čepulić B

Zavod za kliničku transfuziologiju, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Autor nije poslao sažetak.

ng anonymous questionnaire with 20 Likert scale questions to testing frequency (never = 1, rarely = 2, often = 3, always = 4) of representative procedures of pre-analytical phase with recoding of negative questions. Answers were expressed as average grade 1.0-4.0. There were three groups of questions: criteria of acceptance of sample (6), procedures of phlebotomy (6), reporting of results (7) and one separate question about recording of non-conformity in work. The questionnaire was completed by 144 subject (rate response 27%) with median age 47 ranged from 26 to 65 years, 93% women. Subjects were 57% clinical chemist, 40% specialists and 3% professors; 96% of subjects graduated from Faculty of Pharmacy and Biochemistry; 62% had good computer skills; 40% of subjects work in primary care laboratories, 15% in laboratories of general hospitals, 13% in special hospitals, 12% in clinical hospitals, 13% in university hospital centers and 7% in private laboratories.

Results: Average grade of all answers in whole subject group was $X \pm SD = 3.1 \pm 0.4$. There was no difference regarding type of laboratory and institution, professional degree or computer skills. There was no correlation between average grade and age. There is statistically significant difference between average grade of three groups of questions: criteria of acceptance of sample 3.3 ± 0.5 vs. procedures of phlebotomy 2.8 ± 0.5 vs. reporting of results 3.2 ± 0.5 ($P < 0.001$). 21% of subject never or rarely record nonconformities in work while 79% often or always.

Conclusion: Although average grade of 3.1 may seems high, the lowest grade of phlebotomy phase reveals the neediness for additional education on primary sample collection and control of all non-analytical phases.

e-mail: lhonovic@obpula.hr

S07 – Transplantation

S07-1

Cord blood as a source of stem cells

Golubić-Čepulić B

Department of Clinical Transfusiology, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

The author did not provide an abstract.

S07-2

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica u djece s primarnim imunodeficijencijama

Kelečić J

Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Primarne imunodeficiencije nasljedni su poremećaji imunosti, obično s lošom prognozom. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) liječenje je izbora u mnogih bolesnika s primarnim imunodeficijencijama (PID), npr. bolesnika s teškom stanično humoralnom imunodeficijencijom (SCID), Wiskott-Aldrich sindromom (WAS), spolno vezanim hiper IgM sindromom, kroničnom granulomatoznom bolešću, Chediak-Higashi sindromom, spolno vezanim limfoproliferativnim sindromom, hemofagocitnim sindromima. Prve TKMS srodnog podudarnog darivatelja u bolesnika s primarnim imunodeficijencijama učinjene su 1968. godine u tri bolesnika (dva s teškom stanično humoralnom ID/SCID, i jednog bolesnika s Wiskott-Aldrich sindromom/WAS). Od tada postignut je velik napredak u liječenju bolesnika s primarnim imunodeficijencijama transplantacijom krvotvornih matičnih stanica. Nekoliko čimbenika utjecalo je na poboljšanje ishoda TKMS: 1) poboljšanje tehnika tipizacije tkiva, 2) mogućnost određivanja subpopulacija i broja hematopoetskih stanica, 3) dostupnost transplantata HLA-podudarnih nesrodnih darivatelja (koštana srž, periferne matične stanice, umbilikalna krv), 4) manje agresivni protokoli u pripremi bolesnika za transplantaciju s posljedično manjim brojem komplikacija u posttransplantacijskom razdoblju. Važni čimbenici koji utječu na rezultat liječenja su dob bolesnika i njegovo zdravstveno stanje. Niža životna dob i odsutnost teških infekcija, posebice virusnih (herpes virusi, enterovirusi) smanjuju rizik od komplikacija u posttransplantacijskom razdoblju. Najpovoljniji ishod za bolesnike s PID postiže se transplantacijom krvotvornih matičnih stanica srodnog podudarnog darivatelja, koja je usješna u oko 90% bolesnika s teškom stanično humoralnom imunodeficijencijom (SCID), spolno vezanim hiper IgM sindromom, Wiskott-Aldrich sindromom i drugim spolno vezanim imunodeficijencijama. Mogućnost liječenja transplantacijom krvotvornih matičnih stanica podudarnog srodnog darivatelja je ograničena. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica djelomično podudarnog srodnog darivatelja u bolesnika sa SCID-om povezana je sa značajno odgođenim i nekompletnim oporavkom imunološkog sustava. Zbog dostupnosti krvotvornih matičnih stanica nesrodnih darivatelja TKMS optimalan je izbor za liječenje mnogih bolesnika s primarnim imunodeficijencijama. Izbor odgovarajućeg darivatelja, liječenje i kontrola infekcija, priprema

S07-2

Haematopoetic stem cell transplantation in primary immunodeficiencies

Kelečić J

Department of Pediatrics, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Primary immunodeficiencies (PIDs) are complex congenital disorders characterised by impairment of innate or adaptive immunity, and usually a poor prognosis. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) represents a curative approach in many of these disorders, including severe combined immunodeficiencies (SCIDs), Wiskott-Aldrich syndrome, phagocyte disorders such as chronic granulomatous disease and leucocyte adhesion deficiency, Chediak-Higashi syndrome, hemophagocytic syndromes, X-linked hyper IgM syndrome, X-linked lymphoproliferative syndrome. The first hematopoietic stem cell transplantation with durable success in humans were reported in 1968 in three patients with primary immunodeficiencies who received grafts from HLA-matched siblings (two with severe combined immunodeficiency, and one with Wiskott-Aldrich syndrome). Since then significant progress has been made with HSCT for PIDs. There are several factors that influence the outcome of HSCT in PIDs patients: 1) high resolution tissue typing, 2) ability to phenotype and quantitate hematopoietic stem cells, 3) availability of closely matched unrelated donor bone marrow, peripheral blood stem cells and cord blood, 4) the application of reduced intensity conditioning regimens pre-transplant associated with significantly reduced early post-transplant mortality. The most important factors are the age at transplant and general health of the patient. Young age is associated with fewer comorbidities and less frequent pre-transplant exposure to herpes family and enteric viruses, thus lowering the risks of related post-transplant complications. The optimal results of HSCT in primary immunodeficiencies have long been obtained with related HLA-identical donors. HSCT using HLA-identical healthy sibling donors can provide correction of PIDs such as SCID, Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) and other X-linked immunodeficiencies in approximately 90% of the cases. This option is limited to a minority of patients. Transplantation from mismatched related donors has been used with good results mainly in infants with severe combined immunodeficiency, but has been associated with significantly delayed or incomplete immune reconstitution. Recent data indicate that transplantation from matched unrelated donors and cord blood transplantation represent valid alternatives, which can be used in all forms of severe primary immunodeficiency.

bolesnika prije transplantacije znatno utječu na povoljan ishod transplantacije krvotvornih matičnih stanica u bolesnika s primarnim imunodeficiencijama.

e-pošta: jadranka.kelecic@zg.t-com.hr

S07-3

Hepatitis C i ortotopna transplantacija jetre

Čolić-Cvrlje V

Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

HCV infekcija najčešća je indikacija za transplantaciju jetre u Europi: 40–60%. Ishod ortotopne transplantacije jetre (OTJ) zbog HCV infekcije je univerzalna virusna reinfekcija i recidiv hepatitisa s progresijom u cirozu jetre. Učestalost progresije bolesti i teških oblika HCV kroničnog hepatitisa postOTJ u porastu su posljednjih godina.

Indikacije za OTJ su: jetrena dekompenzacija CTP > 7, refraktorni ascites, encefalopatija, preboljeli spontani bakterijski peritonitis, krvarenje iz varikoziteta jednjaka unatoč liječenju. HCV i HCC na listi su bez jetrene dekompenzacije, uz Milanske kriterije: 1 tumor manji od 5 cm, 3 tumora manja od 3 cm, bez invazije u veće krvne žile, bez ekstrahepatalnih metastaza. Bolesnici imaju prioritet s dodatnim MELD bodovima 20–24 koji se povisuju svaka 3 mjeseca. Posttransplantacijski dolazi do HCV reinfekcije i HCV RNA je pozitivna u serumu. 75% bolesnika razvije akutni hepatitis kroz 6 mjeseci postOTJ, 80% kronični hepatitis kroz 1–2 g, 30% cirozu kroz 5 godina, < 10% FCH. Čimbenici povezani s težinom, progresijom bolesti i preživljavanjem postOTJ povezani su sa domaćinom, virusom, okolinom, donorom. Pre i postOTJ vrijednosti HCV RNA su prediktor težine oboljenja jetre postOTJ. Donorski faktori povezani s teškim recidivom HCV: dob > 50, steatoza - lošiji ishod, prolongirano vrijeme ishemije, CMV koinfekcija. Kortikosteroidi povećavaju HCV viremiju, a bolusi su štetni za primaoca. Nema razlike u težini HCV recidiva u odnosu na terapiju takrolimusom ili ciklosporinom. MMF nema utjecaja na razinu HCV RNA. Pretransplantacijska antivirusna terapija daje se kod visokih vrijednosti HCV RNA prije OTJ. Antivirusna terapija kod Child B i Child C ciroze se teško provodi i rezultira sa SVR 13% kod genotipa 1. Antivirusna terapija ograničena je za Child A cirozu. Preemptivna terapija 4–6 tjedana postOTJ je profilaksa, ali je slaba antivirusna efikasnost i loša podnošljivost. Terapija za kronični recidivirajući HCV hepatitis je kom-

pies. Optimal donor choice, monitoring of infection and preemptive treatment has resulted in a significant improvement for severe form of primary immunodeficiencies.

e-mail: jadranka.kelecic@zg.t-com.hr

S07-3

Hepatitis C i orthotopic liver transplantation

Čolić-Cvrlje V

Department of Internal Medicine, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

HCV infection in Europe and USA is the most common indication for liver transplantation 40–60%. Outcome of HCV related OLT is universal viral infection and recurrent hepatitis C with progression to cirrhosis. The frequency of disease progression and the risk for severe HCV hepatitis postOLT are increasing in recent years.

Indication for OLT are liver decompensation CTP > 7, refractory ascites, encephalopathy, history of spontaneous bacterial peritonitis, variceal bleeding unresponsive to treatment, hepatocellular carcinoma. HCV + HCC coexistence are listed in the absence of hepatic decompensation according the Milan criteria: 1 nodule less than 5 cm, 3 nodules less than 3 cm, absence of vascular invasion, absence of extrahepatic metastases. Pts are given added priority with minimum MELD score 22 that increases every three months.

Posttransplant HCV recurrent infection is evident by reappearance of HCV in serum, decrease of HCV RNA in anhepatic phase. HCV RNA level increases rapidly 2 weeks postOLT and is 10–20 fold higher 1 year after OLT. 75% patients develop acute hepatitis in 6 months post OLT, 80% chronic hepatitis in 1–2 years, 30% cirrhosis in 5 years and < 10% accelerated FCH. Factors influencing disease severity, progression and survival postOLT are related to host, virus, environment, donor. PreLT and early postLT viral loads are predictors of severe liver disease. Higher preLT viral load – lower is postLT survival.

Donor factors are: age > 50, steatosis - worse outcome, prolonged ischemic time, CMV coinfection. Corticosteroids increase levels of hepatitis C viremia in nontransplant HCV infected pts and postOLT boluses are harmful to HCV recipients. They increase HCV levels. Corticosteroid treatment for rejection have increased risk of death. Greater immunosuppression leads to more severe postOLT HCV hepatitis. There is no difference among patients re-

binacija PEG IFN + RBV. Doza IFN ista kao u netransplantiranih, ribavirin prema klirensu kreatinina. Trajanje terapije najmanje 6 mjeseci nakon negativiziranja HCV RNA. Vrijeme uvođenja terapije: akutni hepatitis, kronični HCV hepatitis, kolestatski fibrozantni hepatitis. Multidisciplinarni pristup zbog optimiziranja pune doze. Upotreba filgastrima (Neupogen) zbog sprječavanja redukcije doze ili prekida terapije. Terapija održavanja za FCH do SVR. Rani virusni odgovor prediktor je SVR. Veća efikasnost kod non-1-genotipova. Retransplantacija se vrši rutinski. Prediktori lošijeg ishoda su: dob > 50, bilirubinemija, renalna insuficijencija, FCH, rani recidiv sa zatajenjem grafta unutar 1 godine. U Kliničkoj bolnici „Merkur“ izvršeno je 300 OTJ različitih indikacija. Zbog HCV ciroze 41 bolesnik. 9 je umrlo nakon OTJ, 32 bolesnika živi 3 mjeseca do 6 godina, u dijelu bolesnika provodi se terapija pegiliranim interferonom i ribavirinom. Kod 2 bolesnika izvršena je retransplantacija zbog recidiva HCV ciroze.

Loš ishod HCV transplantiranih bolesnika posljednjih godina povezan je sa svim pre i posttransplantacijskim faktorima: domaćinom, donorom, virusom, okolinom, imunosupresijom, terapijom kortikosteroidima, uspjehnosti pre i postOTJ antivirusne terapije, retransplantacijom. Bolesnike s recidivom oboljenja potrebno je liječiti antivirusnom terapijom pegiliranim interferonom i ribavirinom.

e-pošta: vesnaliccivrlje@yahoo.com

S07-4

Imunološki status u transplantaciji solidnih organa

Šiftar Z

Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

Uvod: Transplantacija je danas široko prihvaćena metoda izbora u liječenju pacijenata s terminalnim stadijem bolesti bubrega, jetre, pankreasa, koji mogu podnijeti transplantacijski zahvat i dugotrajno uzimanje imunosupresivne terapije, neophodne za preživljenje presađka i samog pacijenta.

Prosudba optimalnog doziranja kombinirane terapije, inicijalne i terapije održavanja, je još uvijek jedan od najvećih problema u transplantaciji bubrega. Akutno odbacivanje može dovesti do gubitka presađka i vrlo je važan rizikni faktor za nastanak kroničnog odbacivanja, pri čemu T limfociti igraju važnu ulogu u patogenezi odbacivanja. U najmanju ruku, barem određene limfocitne skupine bi morale odražavati sliku aktiviranih stanica koje se nalaze

ceiving tacrolimus or cyclosporin. MMF treatment has no impact on HCV levels. With higher RNA levels preOLT there is 30% greater mortality. In cirrhosis Child B and C antiviral therapy is poor tolerated with serious AE. SVR is only 13% in genotype 1. Antiviral therapy is limited to Child A cirrhosis. Posttransplant antiviral therapy is preemptive therapy for prophylaxis is tolerable but not efficient. Therapy for established HCV recurrence is PEG IFN monotherapy or PEG IFN+RBV combination. Dose reduction of PEG IFN is 80% patients. Low initial doses of ribavirin are required with gradual dose escalation. Retransplantation for HCV is routine. Poor outcome predictors are: age > 50, high bilirubin, renal failure, FCH. Indications for ReTx is therefore without consensus. In hospital "Merkur" 300 OLT were performed for different indications. 41 pts for HCV cirrhosis. 9 pts died post OLT, 32 pts lives 3 months to 6 years. Some pts are treated with PEG IFN + RBV. 2 pts were retransplanted for HCV cirrhosis recidive.

In conclusion the worse outcome of HCV related patients in recent years is associated with the all pretransplant and posttransplant variables: host, donor, viral, environment, immunosuppression, corticosteroid therapy, success of pre and postOLT antiviral therapy, retransplantation.

e-mail: vesnaliccivrlje@yahoo.com

S07-4

Immune profile in solid organ transplantation

Šiftar Z

Institute of Clinical Chemistry, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

Introduction: Transplantation is now widely accepted method of choice in the treatment of patients with terminal stage kidney, liver, pancreas disease etc who can resist transplantation procedure and long-term intake of immunosuppressive therapy, necessary for graft survival and the patient.

Assessment of the optimal dosage of combined therapy, the initial and maintenance therapy, is still one of the greatest problems in kidney transplantation. Acute rejection may lead to graft lost and it is an important risk factor for the emergence of chronic rejection, in which T cells play an important role in the pathogenesis of rejection. At least certain groups of lymphocyte in circulation should reflect the image of active cells that are found locally

lokalno unutar presađka. Trenutačno ne postoji pojedinačni biljeg koji bi sigurno predvidio odbacivanje izuzev PHD analize bubrežne biopsije i kontinuirano praćenje raspodjele limfocitnih populacija može imati klinički značaj. Za direktno mjerenje efektivnog učinka imunosupresivne terapije na staničnoj razini otprije su korišteni broj T limfocita i broj CD4+ T limfocita, omjer CD4/CD8, dvostruko pozitivna (CD3+CD4+CD8+) i dvostruko negativna (CD3+CD4-CD8-) populacija T limfocita, te broj aktiviranih T limfocita (CD25+).

Materijal i metode: Tijekom 2007. i 2008. godine 72 transplantirana pacijenta u Kliničkoj bolnici „Merkur“, (54 bubreg, 13 bubreg/pankreas /SPKT/ i 5 bubreg/jetra /LKT/), 42 muških i 30 žena, prosječne dobi od 44 godina (raspon 16-68), je primilo kombiniranu, inicijalnu, prije transplantacije: kortikosteroid, kalcineurinski inhibitor, anti-CD25 ili anti timocitni globulin i terapiju održavanja, poslije transplantacije: kortikosteroid, kalcineurinski inhibitor, anti-CD25 ili anti timocitni globulin, mikofenolat mofetil. Histološki nalaz indicirane biopsije bubrega tijekom prve godine je potvrdio akutno odbacivanje u 27 pacijenta (21 bubreg, 4 SPKT, 2 LKT). Provedeno je višestruko određivanje brojnosti limfocitnih populacija u venskoj krvi: T limfocita, B limfocita, NK stanica, CD4+ i CD8+ T limfocita, aktiviranih T limfocita: CD25+, CD69+, CD127+, aktiviranih (CD25+) CD4 i CD8 T limfocita, i specifične populacije T limfocita, CD3+CD4+CD25high+ metodom protočne citometrije. Kvantifikacija limfocitnih populacija je urađena na protočnom citometru EPICS XL, Coulter, prema „lizaraj/ne peri“ standardnom postupku s FlowCount kalibracijskim česticama, uz uvjete čitanja na citomeru prema protokolu CD45/postranično raspršenje (SSC). Obilježavanje stanica je urađeno sa direktno obilježenim protutijelima za protočnu citometriju firme Beckman-Coulter i Dako. Rezultati mjerenja su bili u suglasju i unutar ciljnih vrijednosti unutarnje i vanjske kontrole kvalitete UKNEQAS Immune Monitoring.

Rezultati: Nakon indukcijske faze, očekivano se javlja smanjenje brojnosti svih skupina limfocitne populacije, pri čemu je pad drastičniji kada se primjenjuje antitimocitni globulin umjesto anti-CD25. Tijekom terapije održavanja postupno se javlja oporavak istih, do normalizacije unutar 3 mjeseca, pri čemu nije uočena različitost ponašanja između 2 skupina pacijenata. Broj aktiviranih CD25+ T limfocita tijekom 1 mjeseca raste i uglavnom se nalazi u populaciji CD4+ T limfocita. Populacija CD3+CD4+CD25high+ je dio CD25 aktiviranih CD4+ T limfocita, a literaturno ima pozitivan efekat na stabilnost presađka, za razliku od CD69+ aktiviranih T limfocita. Pozitivnost biljega CD25+ na CD8+ se javlja usporedo sa izražajem na CD4+ T limfocitima i tada govori u prilog upalnim komplikacijama, tipa infekcija. Rezultati mjerenja na EPICS XL su ponovljivi i provjereni u praksi na drugom citometru, FC500, Beckman-Coulter.

within graft. So far, there is no single marker that would safely predict rejection except PHD analysis of renal biopsy, and continuous monitoring of lymphocyte population distribution may have clinical significance. To directly measure the effective impact of immunosuppressive therapy at the cellular level previously were used T cell number and the number of CD4+T lymphocytes, CD4/CD8 ratio, double positive (CD3+CD4+CD8+) and double negative (CD3+CD4-CD8-) populations of T lymphocytes, as the number of active T lymphocytes (CD25+).

Material and methods: During 2007 and 2008 there were 72 transplanted patients in „Merkur“ University Hospital (54 kidney, 13 kidney/pancreas, /SPKT/ and 5 kidney/liver/LKT/), 42 male and 30 female, average age 44 years (range 16-68), who have received a combined, initial, prior transplantation: corticosteroids, calcineurin inhibitor, either anti-CD25 or polyclonal antithymocyte globulin (ATG) and maintenance therapy, after transplantation: corticosteroids, calcineurin inhibitor, either anti-CD25 or polyclonal antithymocyte globulin (ATG), mycophenolate mofetil. Histological findings of indicated renal biopsy during the first year has confirmed acute rejection in 27 patients (21 kidney, 4 SPKT, 2 LKT). The multiple determination of the number of lymphocyte populations in venous blood: T lymphocytes, B lymphocytes, NK cells, CD4+ and CD8+ T lymphocytes, active T lymphocytes: CD25+, CD69+, CD127+, activated (CD25+) CD4 and CD8 T lymphocytes, and specific population of T lymphocytes, CD3+CD4+CD25high+ was done using flow cytometry. Quantification of lymphocyte population is made on a flow cytometer Epics XL, Coulter, according to „lyse/no wash“ standard procedure with FlowCount calibration particles, with the analyses conditions according to CD45/side scatter protocol (SSC). The staining has been done with antibodies for flow cytometry, directly conjugated, by Beckman-Coulter, and Dako. Measurement results were in accordance and within the target value of internal and external quality assurance programme UKNEQAS Immune Monitoring.

Results: After the induction phase, as expected, reducing the numbers occurs in all groups in lymphocyte compartment, with drastic decrease when ATG was applied instead of anti-CD25. During maintenance therapy, gradually recover of the same occurs, until normalization within 3 months, where diversity in behaviour is not observed between the 2 groups of patients. Number of activated CD25+ T lymphocytes grows during the 1 month and mainly is located in population of CD4+ T lymphocytes. Population of CD3+CD4+CD25high+ is a part of CD25+ activated CD4+ T lymphocytes, and according to literature has a positive effect on the graft stability unlike CD69+ activated T lymphocytes. Positivity of CD25 on CD8+ occurs in parallel with the expression on CD4+ T cells, and then speaks in favour of treating inflammation complications, like infection. The results of measurement

Zaključak: Longitudinalno praćenje broja imunskih stanica u cirkulaciji je korisno u procjeni efikasnosti imunosupresivne terapije na staničnoj razini i oporavka pacijenta nakon kirurškog zahvata u transplantaciji bubrega, premda nedovoljno osjetljivo za predskazivanje odbacivanja presaadka.

e-pošta: zoran.siftar@hdmh.hr

S07-5

Praćenje imunosupresivne terapije transplantiranih bolesnika

Ožvald I, Šurina B

Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

Praćenje uspješnosti transplantacije bolesnika spada u interdisciplinarni zadatak kliničara i medicinskih biokemičara. U Kliničkoj bolnici „Merkur“ od 1998. g. učinjeno je 300 ortotopnih transplantacija jetre (OLT) i 100 transplantacija bubrega, te je razvoj transplantacijske medicine u našoj Bolnici zasigurno doprinio ulasku Hrvatske u članstvo Eurotransplanta od 5. mj. 2006. god.

Laboratorijska medicina prati uspješnost i/ili odbacivanje presaadka etabliranim „transplantacijskim follow-up protokolom“, koji uključuje: KKS, PV, PV-INR, fibrinogen, AST, ALT, GGT, ALP, ChE, bilirubin ukupni i direktni, ukupni kolesterol, ukupni proteini, albumini, CRP, elektroliti u serumu (K, Na, Ca-ukupni i ionizirani, magnezij-ukupni i ionizirani), ureja, kreatinin, glukoza, pH i plinovi u krvi, koji je orijentiran na praćenje općeg statusa bolesnika, posebice na jetrenu i bubrežnu funkciju.

Osim navedenih laboratorijskih pretraga, vrlo je značajno praćenje uvedene imunosupresivne terapije, koja u ovih bolesnika predstavlja doživotnu terapiju. Za svakog bolesnika potrebno je titriranje i uvođenje optimalne i efikasne individualne terapijske doze primjenjivanih imunosupresiva sa svrhom da se postigne terapijski cilj bez izlaganja komplikacijama imunodeficiencije kao što su: infekcija, malignitet ili odbacivanje organa.

U tu svrhu u Zavodu za kliničku kemiju određujemo sljedeće imunosupresive: inhibitore kalcineurina (ciklosporin i takrolimus); selektivne imunosupresive - sirolimus (druge generaciju imunosupresivnih lijekova koji djeluju na imunofilne i omogućavaju alternativu standardnoj imunosupresivnoj terapiji); kao i određivanje inhibitora sin-

ts on the Epics XL are repeatable and proven in practice to another cytometer, FC500, Beckman-Coulter.

Conclusion: Longitudinal monitoring the number of immune cells in circulation is helpful in assessing the efficiency of immunosuppressive therapy at the cellular level and the recovery of patients after surgical procedures in kidney transplantation, although insufficiently sensitive for prediction of graft rejection.

e-mail: zoran.siftar@hdmh.hr

S07-5

Monitoring of immunosuppressed therapy in transplanted patients

Ožvald I, Šurina B

Institute of Clinical Chemistry, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

Monitoring of successful transplantation is an interdisciplinary task of clinicians and medical biochemists. In Merkur University Hospital 300 orthotopic liver transplantations (OLT) and 100 kidney transplantations have been performed since 1998. Therefore, we strongly believe that the development of transplantation medicine in our hospital has contributed to the Croatian membership in Eurotransplant since May 2006.

Laboratory medicine monitors the success and/or rejection of transplant by established "transplantation follow-up protocol" which includes CBC, PT, PT-INR, fibrinogen, AST, ALT, GGT, ALP, ChE, total and direct bilirubin, total cholesterol, total proteins, albumins, CRP, serum electrolytes, (K, Na, total and ionized Ca, total and ionized Mg), urea, creatinin, glucose, pH and blood gasses, directed towards follow-up of general patient's state, especially towards liver and kidney function.

Beside these tests monitoring of immunosuppressed therapy is very important, which means lifelong therapy for these patients. Each patient needs titration and introduction of the optimal and efficient therapy dosage of appropriate immunosuppressive with purpose to achieve the therapeutic goal without exposing patient to immunodeficiency complications like infections, malignancy or organ rejection.

Therefore, in our Department of Clinical Chemistry we determine following immunosuppressives: calcineurin inhibitors (cyclosporin and tacrolimus), selective immunosuppressives – sirolimus (the second generation of immunosuppressive drugs which affect immunofilins and

teze nukleotida: mikofenolat, koji se primjenjuju u obliku monovalentne ili polivalentne kombinirane terapije. Imunosupresivi selektivnim i specifičnim djelovanjem na stanice imunog sustava, posebice T limfocite, drže te stanice u stanju tolerancije prema presađku. Vrlo velika varijabilnost u bioraspoloživosti i distribuciji uvjetuje kontinuirano mjerenje koncentracije lijeka u cirkulaciji jer svaki imunosupresiv ima svoj terapijski raspon unutar uskih granica i doza se titrira prema izmjerenoj razini u cirkulaciji.

Gore navedene laboratorijske pretrage ne mogu razlikovati promjene nastale uslijed akutnog odbacivanja ili disfunkcije presađka druge etiologije, kao što ne mogu odrediti stupanj-težinu odbacivanja. S toga konačni odgovor daje histološki nalaz kao „zlatni standard“, koji nije uvijek moguć, te je zato praćenje ishoda transplantiranog bolesnika interdisciplinarni zadatak.

U našem Zavodu određuju se: ciklosporin od 1998. g. (FPIA), takrolimus od 2002. g. (MEIA), everolimus (FPIA) od 2006.-2008. g., sirolimus od 2008. g. (MEIA) i mikofenolat od 2006. g. (EMIT).

Od 300 OLT-a, ukupno jednogodišnje preživljenje je 85% te višegodišnje preživljavanje od 80%, što je usporedivo s drugim transplantacijskim centrima u Europi. Transplantacije jetre su izvršene uz poštivanje svih kriterija Eurotransplanta (odabir pacijenata), u bolesnika različitih jetrenih oboljenja: alkoholne bolesti jetre, oboljenja izazvanih infekcijom hepatitis C virusom, primarnom bilijarnom cirozom, kriptogenim oboljenjima jetre, hepatocelularnim karcinomom, metaboličkim deficitom alfa-1-antitripsina, sindroma Budd Chiari, mezenhimalnog hemangioendotelioma, nealkoholnog steatohepatitisa, autoimunog hepatitisa, Wilsonove bolesti.

Konačni nam je cilj uz rutinski follow-up gore navedene imunosupresivne terapije koja se primjenjuje u bolesnika transplantiranih u Kliničkoj bolnici „Merkur“ ponuditi „optimalni algoritam“ imunosupresivne terapije po bolesniku u korelaciji sa kliničkom efikasnošću u predviđanju akutnog ili kroničnog odbacivanja presađka.

Na osnovu dobivene dijagnostičke efikasnosti određivanja „kritičnih lijekova“, tj. imunosupresiva eventualno doprinjeti postavljanju konačnog cilja kako za kliničara tako i za medicinskog biokemičara, a to je dobar ishod transplantiranog bolesnika.

e-pošta: iozvald@gmail.com

enable the alternative to the standard immunosuppressive therapy); as well as estimation of nucleotide synthesis inhibitors: micofenolate, applied as combination of mono- or polyvalent therapy.

By its selective and specific impact on cells of immune system, especially on T-lymphocytes immunosuppressives provide tolerance to these cells to the transplant. Due to strong variability in bioavailability and distribution it is necessary continuously to measure drug concentrations in circulation, because every immunosuppressive has its therapeutic range within narrow limits and the dosage is titrated by the measured levels in circulation.

Mentioned tests cannot differ between changes caused by acute rejection and transplant dysfunction of other etiology, nor can they determine the severity of rejection. Therefore, the final answer is provided by histological test method as golden standard which is not always possible. That is what makes the follow-up of a transplantation outcome an interdisciplinary task.

In our Department we determine levels of: cyclosporin since 1998 (FPIA), tacrolimus since 2002 (MEIA), everolimus (FPIA) 2006-2008, sirolimus since 2008 (MEIA) and micofenolat since 2006 (EMIT).

From 300 OLT the overall one year survival rate was 85% and survival rate for several years was 80% what concurs with results from other European transplantation centers. Liver transplantations were performed completely in concordance with Eurotransplant criteria (patient selection) on patients with different liver diseases: alcohol-induced liver disease, liver diseases caused by Hepatitis C virus infection, primary biliary cirrhosis, cryptogen liver disease, hepatocellular carcinoma, metabolic alpha 1 antitrypsin deficiency, Budd-Chiari syndrome, mesenchymal hemangioendothelioma, nonalcoholic steatohepatitis, autoimmune hepatitis, Wilson's disease.

Our final goal is supported by routine follow-up of immunosuppressive therapy which is already in usage in Merkur University Hospital to offer the "optimal algorithm" of immunosuppressive therapy for a patient in correlation with clinical efficiency in prediction of acute or chronic transplant rejection.

Based on diagnostic efficiency in determination of "critical drugs", i.e. immunosuppressives, we would like to contribute to the final goal setting for clinicians as well as for medical biochemists and this goal is a successful outcome of a transplantation.

e-mail: iozvald@gmail.com

S08 – Laboratorijska koagulacija**S08-1****Faktor XIII – najnovije spoznaje**

Muszbek L

Sveučilište u Debrecenu, Centar za medicinska i zdravstvena istraživanja, Klinički istraživački centar, Debrecen, Mađarska

Faktor XIII (FXIII) kruži u plazmi kao tetramerički zimogen (pFXIII; FXIII-A2B2). Njegova potencijalno aktivna podjedinica A (FXIII-A) je sintetizirana u stanicama koje potječu iz koštane srži; dakle, prisutan je u trombocitima i monocitima/makrofazima u obliku dimera (cFXIII; FXIII-A2). U plazmi ima viška zaštitne podjedinice B (FXIII-B). Trombin i kalcijevi ioni pretvaraju FXIII u aktivni oblik - transglutaminazu (FXIIIa) u završnoj fazi koagulacijske kaskade. Glavna funkcija FXIIIa je umrežiti lance fibrina i inhibitora plazmina α_2 u fibrin glutaminil-lizil izopeptidnim vezama. Na taj način mehanički učvršćuje fibrin i štiti od fibrinolize. FXIII je višefunkcionalni protein koji je također ključan za održavanje trudnoće i igra važnu ulogu u zacjeljivanju rana i angiogenezi.

Nasljedjen nedostatak FXIII klasificira se kao nedostatak FXIII-A i FXIII-B. Nedostatak FXIII-A je rijedak poremećaj (1:2.000.000), no uzrokuje ozbiljnu hemoragičnu diatezu. Karakteristično je odgođeno krvarenje iz pupčane vrpce te kod bolesnika koji ne primaju nadomjesnu terapiju dolazi vrlo često do subkutanog, intramuskularnog i intrakranijalnog krvarenja. Usporeno zacjeljivanje rana i spontani pobačaji kod žena također su značajke nedostatka FXIII-A. Puno je češći tip 1 nedostatka (niska aktivnost i antigen) nego tip 2 (niska aktivnost s normalnom ili umjereno sniženom koncentracijom antigena). Nedostatak FXIII-B o kojem se rijetko izvještava ima za rezultat blagu diatezu. Opisani su različiti oblici ozbiljnog oblika stečenog nedostatka uslijed neutraliziranih i ne-neutraliziranih antitijela na FXIII-A. Značajan broj bolesnika s antitijelima na FXIII boluje od autoimunih bolesti. Danas je dostupan virusno inaktivirani koncentrat pFXIII za liječenje i prevenciju nedostatka FXIII.

Kvantitativna metoda određivanja aktivnosti FXIII treba se rabiti kao metoda probira prvog izbora za dijagnozu nedostatka FXIII. Tradicionalna kvalitativna metoda rastvaranja ugrušaka (engl. *clot solubly assay*) je zastarjela te se ne bi trebala više rabiti kao metoda probira. Kvantitativne metode za FXIII temelje se na dva principa: 1) mjerenje koncentracije amonijaka ispuštenog tijekom reakcije transglutaminaze i 2) primjena testova koji u reakciji koriste obilježene aminske supstrate (inkorporacijski testovi). Prva metoda je lagana za provedbu, brza kinetička metoda, dok je druga metoda osjetljivija i zahtjeva više vremena.

S08 – Laboratory coagulation**S08-1****Factor XIII – the state of the art**

Muszbek L

University of Debrecen, Medical and Health Science Center, Clinical Research Center, Debrecen, Hungary

Factor XIII (FXIII) circulates in the plasma as a tetrameric zymogen (pFXIII; FXIII-A2B2). Its potentially active A subunit (FXIII-A) is synthesized in cells of bone marrow origin; it is also present in platelets and monocytes/macrophages in dimeric form (cFXIII; FXIII-A2). In the plasma the protective/carrier B subunit (FXIII-B) is in excess. pFXIII is converted into an active transglutaminase (FXIIIa) by thrombin and Ca^{2+} in the terminal phase of clotting cascade. The main function of FXIIIa is to cross-link fibrin chains and α_2 plasmin inhibitor to fibrin through glutaminyl-lysyl isopeptide bonds. This way it mechanically stabilizes fibrin and protects from fibrinolysis. FXIII, a multifunctional protein, is also essential for maintaining pregnancy and plays an important role in wound healing and angiogenesis.

Inherited FXIII deficiencies are classified as FXIII-A and FXIII-B deficiencies. FXIII-A deficiency is a rare (1:2,000,000), but severe hemorrhagic diathesis. Delayed umbilical stump bleeding is characteristic and in non-supplemented patients subcutaneous, intramuscular and intracranial bleeding occurs with relatively high frequency. Impaired wound healing and spontaneous abortion in women also are features of FXIII-A deficiency. Type 1 deficiency (low activity and antigen) is much more frequent than type 2 (low activity with normal or moderately decreased antigen concentration). The rarely reported FXIII-B deficiency results in mild bleeding diathesis. Various forms of severe acquired deficiencies due to neutralizing or non-neutralizing auto-antibody against FXIII-A have been described. A significant portion of patients with an autoantibody against FXIII suffers from autoimmune disease. Virus inactivated pFXIII concentrate is now available for treatment and prophylaxis of FXIII deficiency.

A quantitative FXIII activity assay is to be used as first line (screening) test for the diagnosis of FXIII deficiency. The traditional qualitative clot solubility assay is now obsolete and should not be used as screening test. Quantitative FXIII assays are based on two principles: 1) measurement of ammonia released during the transglutaminase reaction, 2) the incorporation of labeled substrate amine into a glutamine donor substrate protein. The former methods are easy to perform, quick kinetic assays, while the latter ones are more sensitive, but time-consuming labo-

Za klasifikaciju određivanja FXIII-A2B2 i FXIII predlaže se određivanje koncentracije antigena u podjedinici u plazmi i FXIII-A u trombocitima. Mješovita istraživanja i vezane metode koriste se za otkrivanje neutraliziranih i ne-neutraliziranih autoantitijela na podjedinice FXIII.

Uloga FXIII kod trombotičkih bolesti istražuje se prema dva aspekta: 1) povišena koncentracija FXIII pokazuje se kao čimbenik rizika infarkta miokarda i bolesti perifernih arterija kod žena. 2) tijekom zadnjih desetak godina intenzivno se radilo na istraživanju polimorfizma Val34Leu u genu FXIII-A. Ubrzana je proteolitička aktivacija varijante LEU34 FXIII-A te polimorfizam utječe i na strukturu fibrina. Iako postoje proturječni rezultati, meta-analiza istraživanja o kojima izvještavamo pokazala je zaštitnički učinak polimorfizma Val34Leu u genu FXIII-A protiv venske tromboze i protiv koronarne arterijske bolesti. Interakcije između dva gena te gena i okoline kao inzulinska rezistencija ili koncentracija fibrinogena značajno modificiraju učinak polimorfizma.

e-pošta: muszbek@med.unideb.hu

rious methods. For classification determination of FXIII-A2B2 and FXIII subunit antigen in plasma and FXIII-A in platelets are recommended. Mixing studies and binding assays are used to detect neutralizing and non-neutralizing autoantibodies against FXIII subunits.

The involvement of FXIII in thrombotic diseases has been investigated in two aspects. 1) Elevated FXIII level has been shown to be a risk factor of myocardial infarction and peripheral artery disease in women. 2) During the last decade a common polymorphism in the FXIII-A gene, resulting in Val34Leu replacement, has been intensively investigated in this respect. The proteolytic activation of the Leu34 FXIII-A variant is accelerated and the polymorphism also influences the structure of fibrin. Although there are contradictory results, meta-analysis of the reported studies demonstrated the protective effect of FXIII-A Val34Leu polymorphism against venous thrombosis and against coronary artery disease. Gene-gene and gene-environment interactions, like insulin resistance or fibrinogen concentration, considerably modify the effect of the polymorphism.

e-mail: muszbek@med.unideb.hu

S08-2

Povezanost genotipa i fenotipa u von Willebrandovoj bolesti

Zupančić Šalek S

Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Von Willebrandova bolest (vWb) je najčešći nasljedni poremećaj sa sklonošću krvarenjem koji nastaje uslijed kvantitativnog (tipovi 1 i 3) ili kvalitativnog manjka von Willebrandova faktora (vWF). vW bolest se nasljeđuje autosomno dominantno ili recesivno, no žene s blagim oblikom bolesti imaju više simptoma. Objavljena prevalencija vWb u epidemiološkim studijama je do 1% u općoj populaciji iako otprilike 1 u 10.000 osoba ima klinički značajno krvarenje. vWF je veliki glikoprotein koji je bitan u primarnoj hemostazi koja je ovisna o trombocitima, osobito u mikrovaskulaturi. vWF je nositelj prokoagulatnog faktora VIII i štiti ga od proteolitičke degradacije i transportira ga na mjesto ozljede vaskulature. Gen za vWF je lociran na kratkom kraku kromosoma 12 i to 12p13.3.

vW bolest je klasificirana u podskupine: tip 1 - djelomičan manjak vWF, tip 2 - kvalitativni poremećaj i tip 3 - gotovo kompletan nedostatak vWF. Tip 2 se dalje dijeli u četiri kategorije sa specifičnim funkcionalnim defektima: tip 2A

S08-2

von Willebrand disease – link between genotype and phenotype

Zupančić Šalek S

Zagreb University Hospital Centre, Zagreb, Croatia

Von Willebrand disease (vWd) is the most common inherited bleeding disorder and is due to quantitative (types 1 and 3) or qualitative (type 2) defects of von Willebrand factor (vWF). vW disease is inherited by autosomal dominant or recessive patterns, but women with mild forms are more symptomatic. Reported prevalence of vW disease derived from epidemiological studies of up to 1% in the general population although only approximately 1 in 10,000 individuals has clinically significant bleeding. vW factor is a large glycoprotein which is essential to platelet-dependent primary haemostasis, particularly in the microvasculature where high fluid shear forces are present. vWF also acts as a carrier for procoagulant factor VIII (FVIII) in the circulation, protecting FVIII from proteolytic degradation and transporting it to the site of vascular injury. The vWF gene is located on the short arm of chromosome 12 at 12 p13.3. vWD is classified into three main sub-types: Type 1 – a partial quantitative deficiency of

pokazuje selektivni gubitak vrlo visokih multimeri vWF (HMW) i povezano sniženu interakciju trombocita i vWF. Tip 2B je povezan s povećanom afinitetom vWF za trombocitni glikoprotein Ib; tip 2M je povezan uzorkom multimeri kao u normalne osobe no postoji selektivno snižena interakcija vWF i trombocita. Veliki je broj otkrivenih mutacija i karakteriziran u vW bolesti.

Početna dijagnoza vW bolesti zasnovana je na kliničkoj i fenotipskoj informaciji. Genetsko ispitivanje ima ulogu u diferencijalnoj dijagnozi bolesti, ispitivanju obitelji i savjetovanju što je od osobite vrijednosti u tipu 3 vW bolesti. Genetsko ispitivanje ima dodatnu ulogu u diferencijalnoj dijagnozi razlikujući vW bolest tip 2 N i blage hemofilije. Identifikacija i genetska osnova poremećaja informira nas o izboru liječenja i pojašnjava mehanizam pojedinih podtipova vW bolesti. Očito je da genetsko testiranje ima ograničenu vrijednost u slučajevima gdje fenotip jasno otkriva podtip vW bolesti.

Karakterizacija fenotipa i identifikacija mutacija u genu vWF u bolesnika s vW bolesti doprinosi razumijevanju genetike i biokemije vWF i vW bolesti.

e-pošta: silva.zupancic-salek@zg.t-com.hr

VWF, type 2 – a qualitative abnormality of VWF, and type 3 – a virtually complete absence of VWF. Type 2 is further divided into four sub-categories with specific functional defects: type 2A shows a selective loss of high molecular weight (HMW) vWF multimers and an associated decrease in platelet-vWF interaction; Type 2B is associated with and increased affinity of VWF for platelet glycoprotein Ib; type 2M is associated with a vWF multimers pattern that is similar to normal, but with reduced vWF-platelet interaction. An enormous diversity of mutations has been characterized in VWD.

The initial diagnosis of vW disease is based on clinical and phenotypic information. Genetic analysis may provide information to confirm or support the initial diagnosis and additionally to permit family studies and counseling which are of particular value in type 3 vWD. Genetic investigation also plays a role in differential diagnosis. Genetic investigation also plays a role in differential diagnosis, distinguishing vWD type 2N and mild hemophilia.

Identification of the genetic basis of the disorder may inform treatment choices and improve our understanding of the mechanism underlying different vWD subtypes. It is apparent that genetic testing is likely to have limited clinical utility in cases where the phenotype clearly reveals the vWD sub-type.

Characterization of the phenotype and identification of mutations in VWF gene in patients with vW disease contribute to understanding of the genetics and biochemistry of VWF and VWD.

e-mail: silva.zupancic-salek@zg.t-com.hr

S08-3

Hemostatski sustav kod djece

Coen Herak D

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Značajke hemostatskog sustava kod djece nisu bile u potpunosti poznate dugi niz godina ponajprije zbog tehničkih poteškoća s uzorkovanjem u male djece te potrebe za relativno velikom količinom uzorka krvi za analizu. Najveći doprinos razumijevanju hemostatskog sustava kod djece može se pripisati Maureen Andrew, koja je prva objavila referentne intervale 30-tak hemostatskih parametara za djecu prema dobi, zasebno za nedonošćad, zdravu novorođenčad te djecu 1-16 godina starosti. Spoznaja o različitim vrijednostima velikog broja hemostatskih parametara između djece i odraslih, kao i o njihovoj promjeni

S08-3

Hemostatic system in children

Coen Herak D

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of Medicine and Clinical Hospital Center, Zagreb, Croatia

For many years, understanding and characterization of hemostatic system in children has lagged behind those of adults, primarily due to technical difficulties in blood sampling in small children and the requirement of large amounts of blood volume. The greatest contribution in this field has been done by Maureen Andrew who first published age-dependent reference intervals for premature infants, healthy full-term newborns, and children 1-16 years of age. The knowledge that the levels of multiple hemostatic parameters differ between children and

tijekom djetinjstva postavilo je temelj koncepta razvojne hemostaze.

Hemostaza je dinamičan proces koji započinje in-utero. Fetalna jetra započinje sintezu fibrinogena u šestom gestacijskom tjednu, dok se zgrušavanje krvi i fibrinolitička aktivnost mogu opaziti u jedanaestom gestacijskom tjednu. Fiziološke koncentracije koagulacijskih proteina postupno rastu tijekom fetalnog i neonatalnog života. Molekularne strukture većine fetalnih koagulacijskih proteina su istovjetne zrelim strukturama, osim fibrinogena i plazminogena koje sadrže veći udjel sijalinske kiseline i von Willebrandovog faktora (VWF) koji se sastoji od multimeriziranih izrazito velike molekularne mase. Promjena fetalnog VWF u adultni oblik odvija se tijekom prvih tjedana postnatalno.

U novorođenčadi plazmatske koncentracije faktora ovisnih o vitaminu K (II, VII, IX, X) i kontaktnih faktora (XI, XII prekalkireina, kininogena velike molekularne mase) su snižene i iznose približno 50% vrijednosti u odraslih. Postupan se porast koncentracija odvija tijekom prvih 6 mjeseci života te, iako dostiže približno 80% vrijednosti u odraslih, ostaju snižene tijekom djetinjstva. Plazmatske vrijednosti gotovo svih inhibitora zgrušavanja su snižene u odnosu na odrasle te iznose približno 20% za inhibitor puta tkivnog faktora, 35% za protein C (PC) i protein S (PS), te 50% vrijednosti za antitrombin i heparinski kofaktor II. Iako se vrijednosti odraslih dostižu tijekom 6 mjeseci života, koncentracije PC ostaju snižene tijekom djetinjstva sve do mladenačke dobi. Nadalje, u novorođenčadi se PS nalazi isključivo u slobodnom, aktivnom obliku zbog nedostatka veznog proteina C4b.

U novorođenčadi su plazmatske koncentracije samo malog broja faktora zgrušavanja (V, VIII, XIII i fibrinogena) približno slične vrijednostima u odraslih. Za razliku od toga, vrijednosti VWF su povišene tijekom prva 2 mjeseca života, dok su vrijednosti alfa 2 makroglobulina približno dvaput više u odnosu na vrijednosti u odraslih te ostaju povišene tijekom djetinjstva.

Fibrinolitički sustav u djece je razvojan proces sličan sustavu zgrušavanja. Vrijednosti plazminogena su snižene na 50% vrijednosti, a vrijednosti inhibitora plazmina na 80% vrijednosti u odraslih sve do 6 mjeseci života. Plazmatske koncentracije antigene komponente tkivnog aktivatora plazminogena značajno su povišene neposredno nakon rođenja, progresivno se smanjuju nakon prvog dana života te ostaju snižene tijekom djetinjstva za približno 50% u odnosu na odrasle. Za razliku od toga, plazmatske koncentracije antigene komponente inhibitora aktivatora plazminogena 1 značajno su povišene nakon rođenja te ostaju povišene tijekom djetinjstva. Nezrelost hemostatskog sustava ima za posljedicu smanjeno stvaranje trombina kao i smanjenu fibrinolitičku aktivnost tijekom djetinjstva u odnosu na odrasle.

adults, and vary over the pediatric age range, has led to introduction of the concept of developmental hemostasis.

Hemostasis is a dynamic process which begins in-utero. Fetal liver begins to synthesize fibrinogen at 5.5 weeks of gestation whereas blood clotting and fibrinolytic activity can be detected at 11 weeks of gestation. Physiologic concentrations of coagulation proteins gradually increase during fetal and neonatal life. The molecular structure of the majority of fetal coagulation proteins is identical to adult structures, except fibrinogen and plasminogen which contain increased amounts of sialic acid and von Willebrand factor (VWF) which is made up of ultra-large molecular weight multimers and changes to the adult plasma form postnatally.

In newborns, plasma concentration of vitamin K-dependent proteins (II, VII, IX, X) and contact factors (XI, XII prekalkikrein, high molecular weight kininogen) are approximately 50% of adult values, increase gradually during the first 6 months of life to about 80% of adult normal values, but remain decreased throughout childhood. Furthermore plasma levels of almost all coagulation inhibitors are reduced, from approximately 20% for tissue factor pathway inhibitor, 35% for protein C (PC) and protein S (PS) to 50% of adult levels for antithrombin and heparin cofactor II. Although adult levels are usually reached by 6 months of age, plasma concentrations of PC remain decreased through childhood until adolescence. In addition PS circulates in newborns only in its free active form due to the absence of C4b binding protein.

Plasma concentrations of coagulation factors V, VIII, XIII and fibrinogen are close to adult values. Moreover, the levels of VWF are increased through the first 2 months of life, while the levels of alpha 2 macroglobulin that are nearly 2-fold higher than adult values, remain increased through childhood.

Fibrinolytic system in children is an evolving age-dependent process similar to coagulation system. Plasminogen levels are decreased to 50% and plasmin inhibitor to 80% of adult values until 6 months of age. Plasma concentrations of tissue-type plasminogen activator antigen are significantly increased at birth, progressively decrease after the first day of life, and remain decreased at approximately 50% of adult values throughout childhood. On the contrary, concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 antigen at birth and throughout childhood are significantly increased compared to adult values. Therefore, the immaturity of hemostatic system in newborns results in decreased thrombin generation and hypofibrinolytic activity during childhood.

Since hemostatic system in children is profoundly different compared to adults, the knowledge of developmental hemostasis and applying age-dependent reference ran-

S obzirom na značajne razlike hemostatskog sustava kod djece u odnosu na odrasle, za ispravno postavljanje dijagnoze hemostatskih poremećaja kod djece te optimalnu prevenciju i liječenje, neophodna je uz poznavanje značajki razvojne hemostaze, primjena referentnih intervala prema dobi.

e-pošta: desireecoen@yahoo.com

S08-4

Procjena kvalitete koagulacijskih analiza i programi vanjske procjene kvalitete

Woods T

UK NEQAS za laboratorijsku koagulaciju, Sheffield, Ujedinjeno Kraljevstvo

Kontrola kvalitete je sveobuhvatni pojam koji opisuje sve poduzete mjere koje osiguravaju pouzdanost laboratorijskih pretraga i nalaza. Unutarnja kontrola kvalitete (engl. *internal quality control*, IQC) i vanjska procjena kvalitete rada (engl. *external quality assessment*, EQA) dvije su različite, no vrlo komplementarne sastavnice programa uspostavljanja kontrole kvalitete rada laboratorija. IQC se primjenjuje kako bi se ustanovilo provode li se brojne tehnike i procesi konzistentno tijekom određenog vremenskog razdoblja i na taj se način garantira dosljednost laboratorija iz dana u dan. EQA se provodi kako bi se otkrio stupanj podudarnosti između laboratorija i ostalih centara. U većim programima EQA kao što je npr. britanski NEQAS (UK NEQAS) za laboratorijsku koagulaciju s više od 1.000 registriranih centara za laboratorijske programe i više od 2.000 centara za program njege uz bolesnika retrospektivnom analizom rezultata dobivenih od uključenih laboratorija mogu se otkriti ne samo laboratoriji s niskom kvalitetom rada, već i reagensi te metode koji daju rezultate koji su nepouzdati te navode na pogrešan zaključak.

Kako bi se odredila kvaliteta rada laboratorija, za svaki se testni uzorak moraju odrediti ciljane vrijednosti. Postoji nekoliko referentnih metoda u hemostazi i teško je odrediti ekspertne laboratorije za velik broj metoda i tehnika koje se primjenjuju za svaku pretragu. Prema tome, UK NEQAS za laboratorijsku koagulaciju kao ciljnu vrijednost koristi medijan vrijednosti svih rezultata pristiglih od sudionika. Za testove probira, u kojima se koriste reagensi različite osjetljivosti, određuje se medijan specifičan za svaki pijedini reagens.

Programi EQA za laboratorijsku koagulaciju organizirani su u velikom broju država i kod tih se programa uzorci distribuiraju periodično ili po ciklusima centrima koji sudjeluju. Individualni programi variraju prema broju ponuđenih

ges are essential for diagnosis, optimal prevention and treatment of hemostatic disorders in children.

e-mail: desireecoen@yahoo.com

S08-4

Quality assessment of haemostatic assays and EQA schemes

Woods T

UK NEQAS for Blood Coagulation, Sheffield, United Kingdom

Quality assurance may be used as an overall term to describe all measures that are taken to ensure the reliability of laboratory testing and reporting. Internal quality control (IQC) and external quality assessment (EQA) are two distinct, yet complementary components of a laboratory quality assurance programme. IQC is used to establish whether a series of techniques and procedures are performing consistently over a period of time, therefore ensuring day to day laboratory consistency. EQA is used to identify the degree of agreement between one laboratory's results and those obtained by other centres. In larger EQA schemes, such as UK NEQAS for Blood Coagulation with over 1000 registered centres for the laboratory based programme and over 2000 centres for the Point of Care Testing (POCT) programme, retrospective analysis of results obtained by participating laboratories permits the identification, not only of poor individual laboratory performance, but also those reagents and methods that produce unreliable or misleading results.

In order to determine laboratory performance, target values must be established for each test sample. There are few established reference methods in haemostasis, and it is difficult to identify expert laboratories for the wide range of methods and techniques used for each test. Consequently, UK NEQAS for Blood Coagulation uses the median value of all results returned by participants as the target value. For screening tests, where different reagent sensitivities are apparent, reagent specific median values are determined.

EQA programmes for Blood Coagulation have been established in a number of countries and in all of these programmes, samples are distributed to participating centres on a periodic or cyclical basis. Individual programmes vary considerably in the numbers of tests or

pretraga i analita, registriranih sudionika, izvoru uzoraka i učestalosti provedbe modula. Opće je prihvaćeno da što je baza podataka sudionika veća, to je bolja usporedba između grupa reagensa, odnosno između analiza rezultata pristiglih od sudionika. Opseg tih usporedbi koje provodi UK NEQAS za laboratorijsku koagulaciju je vjerojatno veći od opsega ostalih programa EQA za laboratorijsku koagulaciju, zbog obuhvaćanja barem 30 različitih pretraga.

Primarna funkcija EQA je ispitivanje znanja i vještina pojedinih laboratorija. To bi trebalo uključivati sve aspekte koagulacije i ponuđeni analiti bi trebali predstavljati najnovije spoznaje struke. Sukladno njihovoj primarnoj funkciji, dobro organizirani programi EQA mogu pružiti informaciju o relativnim značajkama analitičkih procesa uključujući princip metode, reagensne i instrumente. Programi mogu također otkriti i varijabilnost rezultata koja ovisi o metodi, temu o kojoj ćemo nešto više reći u ovom predavanju.

Tajnost podataka važna je značajka programa UK NEQA i informacije o radu pojedinih laboratorija ne smiju se otkrivati nikome osim ovlaštenog voditelja odjela ili njegovog zamjenika.

Poboljšani rad laboratorija nedvojbeno je vezan uz njegovo sudjelovanje u programima EQA. To se ne primjećuje samo u cjelokupnom radu svih laboratorija uključenih u program, čemu svjedoči smanjenje varijabilnosti rezultata između laboratorija, već i kod pojedinačnih laboratorija.

e-pošta: tim.woods@coageqa.org.uk

analytes offered, registered participants, the source of samples and frequency of distribution. It is generally accepted that the larger the participant database, the more robust may be the comparisons between reagent groups, and therefore the analysis of results for individual participants. The scope of these comparisons by UK NEQAS for Blood Coagulation is possibly wider than many other Blood Coagulation EQA schemes, due to the inclusion of at least 30 different tests in the laboratory based programme alone.

The primary function of EQA is proficiency testing of individual laboratories. This should include all aspects of coagulation and analytes offered should represent the current "state of the art". In conjunction with their primary function, well established EQA programmes can also provide information concerning the relative performance of analytical procedures, including the method principle, reagents and instruments. EQA schemes may also identify method-dependent variability of results, a point that will be covered in this presentation.

Confidentiality is an important feature of UK NEQA Schemes, and information regarding individual laboratory performance is not divulged to anyone other than the nominated head of the department or their deputy.

Improved performance has been clearly linked to ongoing participation by a laboratory in EQA programmes. This has been seen not only in overall performance, evidenced by a reduction of the variability of results between laboratories, but also in respect of individual laboratories.

e-mail: tim.woods@coageqa.org.uk

S08-5

Poremećaji hemostaze u pretilosti

Margetić S

Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Pretilost je poznati metabolički čimbenik rizika za nastanak ateroskleroze, kardiovaskularne bolesti (CVD) i posljedične arterijske tromboze. Patofiziologija arterijske tromboze u CVD je složena i multičimbenična, a u njenom nastanku i progresiji hemostatski sustav ima važnu ulogu.

Rezultati dosadašnjih ispitivanja pružaju sve više podataka o prokoagulantnom (protrombotičkom) stanju koje je posljedica poremećaja hemostatskog sustava u pretilih osoba. Poremećaji hemostatskog sustava sinergističkim međudjelovanjem s drugim metaboličkim čimbenicima rizika (inzulinska rezistencija, hiperinzulinemija, dislipide-

S08-5

Disorders of hemostasis in obesity

Margetić S

University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Obesity is a known metabolic risk factor for atherosclerosis, cardiovascular disease (CVD) and consequent arterial thrombosis. Pathophysiology of arterial thrombosis in CVD is complex and multifactorial, in whose development and progression the hemostatic system has an important role.

The results of investigations to date provide more and more data on procoagulant (prothrombotic) state that is a consequence of disorders in hemostatic system in obese subjects. Disorders of hemostatic system by synergistic interactions with other metabolic risk factors (insulin

mija, hipertenzija), često prisutnim u pretilih osoba, dodatno doprinose povećanju sveukupnog rizika za CVD. Povezanost metaboličkih (aterosklerotskih) i protrombotičkih čimbenika u nastanku i progresiji kardiovaskularne bolesti uvelike objašnjava složene patofiziološke procese koji dovode do stvaranja aterosklerotskog plaka, rupture plaka i posljedične arterijske tromboze.

Poremećaji sustava zgrušavanja i fibrinolize u pretilih osoba uključuju sve sastavnice hemostatskog sustava: disfunkciju vaskularnih endotelnih stanica, promjene funkcije trombocita, promjene plazmatske faze zgrušavanja i poremećaj fibrinolitičkog sustava. Pomak fiziološke hemostaze prema protrombotičkom stanju rezultat je pojačane agregabilnosti trombocita, hiperkoagulabilnosti i smanjene fibrinolitičke aktivnosti.

Važno obilježje pretilosti jest kronično subkliničko upalno stanje uzrokovano djelovanjem proupalnih citokina (TNF-alfa, IL-6) iz adipoznog tkiva. Upala i hemostatski sustav tijesno su povezani patofiziološki procesi koji sinergistički djeluju i moduliraju međusobnu aktivnost. Stanje kronične upale u pretilih osoba pokazalo se značajnim čimbenikom poremećaja u hemostatskom sustavu. Proupalni citokini iz adipoznog tkiva izravno uzrokuju disfunkciju endotela narušavanjem ravnoteže u sintezi i djelovanju vazoaktivnih supstanci s proupalnim i prokoagulantnim te protuupalnim i protukoagulantnim svojstvima. U disfunkciji endotela čimbenici koji potiču vazokonstrikciju, proupalno, prokoagulantno i protufibrinolitičko stanje (tromboksan A₂ (TXA₂), von Willebrandov čimbenik (vWF), čimbenik aktivacije trombocita (PAF), inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1)), prevladavaju utjecaj čimbenika sa suprotnim djelovanjem. Disfunkciju endotela potiču i drugi popratni metabolički poremećaji (hiperinzulinemija i dislipidemija) često prisutni u pretilih osoba.

Poremećaj funkcije trombocita u pretilosti očituje se pojačanom aktivacijom i posljedičnom agregacijom trombocita, što dodatno doprinosi protrombotičkom stanju. Pokazano je da u pretilih osoba izostaje fiziološki inhibični učinak inzulina na agregaciju trombocita, a u pretilih osoba s inzulinskom rezistencijom povećana je osjetljivost trombocita na aktivaciju fiziološkim agonistima agregacije (ADP, trombin, kolagen). Pojačanoj aktivaciji trombocita izravno doprinosi i disfunkcija endotelnih stanica povećanom sintezom čimbenika aktivacije i agregacije trombocita (vWF, PAF, TXA₂) uz istodobno smanjenu sintezu inhibitora agregacije (prostaciklin, dušikov oksid).

Promjene plazmatske faze zgrušavanja u pretilosti obilježava povećana aktivnost određenih čimbenika zgrušavanja: fibrinogena, tkivnog čimbenika (TF), čimbenika VII (FVII) i VIII (FVIII). Porast fibrinogena primarno je rezultat kroničnog upalnog stanja potaknutog djelovanjem proupalnih citokina iz adipoznog tkiva na povećanu sintezu u jetri. Disfunkcija endotela i aktivacija upalnih stanica dovode do pojačanog izražaja TF na membrani stanica i izla-

resistance, hyperinsulinemia, dyslipidemia, hypertension), often present in obese subjects, additionally contribute to the overall risk for CVD. The connection of metabolic (atherosclerotic) and prothrombotic risk factors in development and progression of CVD largely explains complex pathophysiological processes that cause atherosclerotic plaque, plaque rupture and consequent arterial thrombosis.

Disorders of coagulation and fibrinolytic systems in obese subjects include all constituents of hemostatic system: dysfunction of vascular endothelial cells, alterations of platelet function, alterations of plasma coagulation phase and abnormality of fibrinolytic system. The shift of physiological hemostasis toward prothrombotic state is the result of enhanced platelet aggregability, hypercoagulability and decreased fibrinolytic activity.

Important feature of obesity is a chronic subclinical inflammatory state caused by action of proinflammatory cytokines (TNF-alfa, IL-6) from adipose tissue. Inflammation and hemostatic system are close related pathophysiological processes that synergistically act and modulate the activity of each other. Chronic inflammatory state in obese subjects turned out to be a significant factor of disorders in hemostatic system. Proinflammatory cytokines from adipose tissue directly cause endothelial dysfunction by disturbing a balance in the production and action of vasoactive substances with proinflammatory and procoagulant and antiinflammatory and anticoagulant properties. In endothelial dysfunction factors that promote vasoconstriction, proinflammatory, procoagulant and antifibrinolytic state (thromboxan A₂ (TXA₂), von Willebrand factor (vWF), platelet activating factor (PAF), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)) prevail the impact of factors with opposite actions. Endothelial dysfunction is also stimulated by other accompanying metabolic disorders (hyperinsulinemia and dyslipidemia) often present in obese subjects.

Disorder of platelet function in obesity manifests as enhanced platelet activation and consequent aggregation, that additionally contribute to the prothrombotic state. It has been shown that a physiological inhibitory effect of insulin on platelet aggregation is absent in obese subjects and in those with insulin resistance there is an increased platelet susceptibility with physiological aggregation agonists (ADP, thrombin, collagen). Dysfunction of endothelial cells contribute also to strengthened activation of platelets by increased synthesis of factors that promote platelet activation and aggregation (vWF, PAF, TXA₂) with simultaneous reduced synthesis of inhibitors of aggregation (prostacyclin, nitric oxide).

Alterations of plasma coagulation cascade in obesity are characterized by increased values of certain coagulation factors: fibrinogen, tissue factor (TF), factor VII (FVII) and factor VIII (FVIII). Elevated fibrinogen level is primarily the

ganja velike količine TF krvi, što rezultira pojačanom aktivacijom sustava zgrušavanja putem aktivacije FVII.

Dobro utvrđen poremećaj u sustavu hemostaze u pretilih osoba je smanjena fibrinolitička aktivnost obilježena sistemnom hipofibrinolizom, primarno zbog povećane sinteze PAI-1. Porast PAI-1 u plazmi pretilih osoba najvećim je dijelom rezultat prekomjerne sinteze u adipocitima posredovane proupalnim citokinima, a dijelom i disfunkcije endotela koja je uzrok povećane sinteze PAI-1 u endotelnim stanicama.

U predavanju će biti prikazani rezultati dosadašnjih ispitivanja o poremećajima hemostatskog sustava u pretilosti.

e-pošta: sandra.margetic1@zg.t-com.hr

result of chronic inflammatory state stimulated by action of proinflammatory cytokines from adipose tissue on enhanced fibrinogen synthesis in liver.

Dysfunction of endothelial cells and activation of inflammatory cells cause increased expression of TF at the cell membranes, with exposing large amounts of TF into blood and increasing activation of coagulation through FVII activation.

Well established disorder of the hemostatic system in obese subjects is diminished fibrinolytic activity characterized by systemic hypofibrinolysis, primarily due to increased synthesis of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). Increased PAI-1 plasma level in obese subjects is mostly the result of excess production in adipocytes mediated by proinflammatory cytokines, and partly of endothelial dysfunction that cause increased synthesis of PAI-1 in endothelial cells.

The results of investigations to date about disorders of hemostatic system in obesity will be presented in the lecture.

e-mail: sandra.margetic1@zg.t-com.hr

S09 – Ateroskleroza

S09-1

Patofiziologija akutnog koronarnog sindroma: od slabog plaka do ranjivog bolesnika

Biasucci LM

Zavod za kardiologiju, Katoličko sveučilište Presvetog srca, Rim, Italija

Nekoliko je čimbenika uključeno u tranziciju između stabilne i asimptomatične koronarne arterijske bolesti (CAD) i akutnog koronarnog sindroma (ACS). Među brojnim i kompleksnim mehanizmima, puknuće aterosklerotskog plaka smatra se glavnim okidačem koji izaziva taj proces. Međutim, jednako je učestala i pojava napuklina ili krvnih ugrušaka uz pojavu jednostavne erozije fibroznog plaka. Taj se fenomen može smatrati rezultatom endotelne aktivacije erozije: aktivirani endotel se može mijenjati od antitrombotskog i antiadhezivnog ka protrombotskom.

Stvaranje plaka je dugoročan proces koji započinje infiltracijom lipida i leukocita te vodi ka remodeliranju arterija. Nakon toga, plak počinje urastati u krvnu žilu te dolazi do sužavanja lumena krvne žile i smanjenja protoka krvi. Aterosklerotski plak je podložan disrupciji, sastoji se od jezgre bogate lipidima u središnjem dijelu ekcentrično zadebljane intime, na kraju s tankom fibroznom kapom. U jezgri se također nalaze i pjenaste stanice markofaga s pu-

S09 – Atherosclerosis

S09-1

Pathophysiology of acute coronary syndromes: from vulnerable plaque to vulnerable patient

Biasucci LM

Institute of Cardiology, Catholic University of Sacred Heart, Rome, Italia

Several factors are implicated in the transition between stable or asymptomatic coronary artery disease (CAD) and ACS. Among the multiple and complex mechanisms, plaque rupture is considered the trigger event in this process. However, equally common is the finding of fissures or of thrombi superimposed on simple erosion of fibrous plaque. This phenomenon can be considered as a result of endothelial activation or erosion: activated endothelium, in fact, may change from antithrombotic and anti-adhesive to prothrombotic.

Plaque formation is a long-standing process, initiating with lipid and leukocyte infiltration and leading to the artery remodelling. Subsequently the plaque starts to grow into the vessel and there is a reduction of the vessel lumen and of the blood flow. Atherosclerotic plaque prone to disruption, consists of a lipid-rich core in the central portion of the eccentrically thickened intima, limited by a

no lipida. Te stanice izlučuju proteolitske enzime kao aktivatore plazminogena i metaloptoteinaze matriksa (MMP) te oslabljuju fibrinsku kapu, i stvaraju velike količine TF, što stimulira stvaranje krvnih ugrušaka. Kod svih stadija stvaranja plaka prisutni su i limfociti, mastociti i neutrofili, te se za njih smatra da su uključeni u patološki proces koji vodi ka razvoju kliničkih manifestacija.

Uz lokalne čimbenike uključene u disrupciju i nestabilnost plaka treba se uzeti u obzir da mnogi bolesnici oboljeli od ACS imaju više od jedne nestabilne koronare lezije. Štoviše, postmortalna istraživanja pokazala su pojave višestrukih napuknuća koronarnog aterosklerotskog plaka kod osoba koje nisu umrle od posljedica srčanih bolesti. Istraživanja intravaskularnim ultrazvukom kod bolesnika s ACS također su pokazala uobičajenu pojavu višestrukih napuklina plaka.

Štoviše, prisutnost višestruko upaljenog koronarnog plaka i raširene koronarne upale i upale miokarda koju smo primijetili kod bolesnika s ACS upućuje na zaključak da bi upala mogla biti odgovorna za simultanu pojavu koronarne nestabilnosti na više mjesta s ili bez puknuća plaka. Nakon pionirskih istraživanja koja su proveli Neri-Serneri i Liuzzo i u kojima su pokazali uzročnu vezu između imuniteta i koronarne nestabilnosti mnogi su drugi autori potvrdili važnost biljega upale kod ACS. Među različitim biljezima upale najviše se proučavao C-reaktivni protein za predviđanje infarkta miokarda i CAD te za predviđanje povratnog događaja kod bolesnika s manifestacijom aterosklerotične bolesti.

Značajke nestabilnosti plaka, opisane ranije u tekstu, postavljaju pitanje što je osjetljivije, plak ili bolesnik? Činjenicu da je osjetljivost plaka isključivo posljedica njegovih karakteristika, osporavaju mnoga zapažanja, od dokaza o prisutnosti brojnih nestabilnih plakova kod istog bolesnika do raširene koronarne upale. Pojam osjetljivog bolesnika ima važne kliničke implikacije.

Sve je više dokaza koji ukazuju na činjenicu da puknuće plaka nije jedini uzrok ACS. Mehanizmi koji dovode do disrupcije plaka ili njegove aktivacije, u biti nisu ograničeni na plak: vjerojatno je da sistemsko upalno stanje zajedno sa stanjem hiperkoagulabilnosti aktivira lokalne hemodinamičke, mehaničke i imunološke reakcije koje vode ka destabilizaciji plaka.

e-pošta: Imbiasucci@virgilio.it

thin fibrous cap. The core also contains many lipid-laden macrophage foam cells. These cells secrete proteolytic enzymes, as plasminogen activators and matrix metalloproteinases (MMPs), weakening fibrous cap, and produce large amounts of TF, stimulating thrombus formation. Also lymphocytes, mast cells and neutrophils are present in all stages of plaque development and are implicated in the pathological process leading to the development of clinical manifestations.

In addition to the local factors, implicated in plaque disruption and instability, one should consider that many ACS patients have more than one unstable coronary lesion. Moreover, post mortem-studies have shown the presence of multiple fissured coronary atherosclerotic plaques in individuals who did not die from cardiac causes. Intravascular ultrasound studies in ACS patients also showed the common presence of multiple fissured plaques.

Moreover, the presence of multiple inflamed coronary plaques and the widespread coronary and myocardial inflammation observed in ACS patients suggest that inflammation may be responsible for simultaneous development of multifocal coronary instability, with or without plaque rupture. Since the pioneering studies by Neri-Serneri and Liuzzo demonstrating a causative link between immunity and coronary instability, many others have confirmed the importance of inflammatory markers in ACS. Among different inflammatory markers, C-Reactive Protein has been the most extensively studied, either for the prediction of incident myocardial infarction, CAD and for the prediction of recurrent events in patients with manifest atherosclerotic disease.

The features of the plaque instability, described above, have raised the question of whether is vulnerable, the plaque or the patient. The idea that plaque vulnerability is exclusively a consequence of plaque characteristics is challenged by many observations, from the evidence of multiple vulnerable plaques in the same patients to that of widespread coronary inflammation. The concept of vulnerable patient has important clinical implications.

Growing evidences suggest that plaque rupture is not the only cause of ACS. Mechanisms leading to plaque disruption or activation, in fact, are not confined to the plaque: it is likely that a systemic inflammatory condition, together with hypercoagulability state, activates local hemodynamic, mechanical and immune reactions leading to plaque destabilization.

e-mail: Imbiasucci@virgilio.it

S09-2

Biološki biljezi aktunog koronarnog sindroma i srčanog zatajenja: financijska pogodnost ili teret?

Christenson RH

Sveučilište u Marylandu, Medicinski fakultet, Baltimore, MD, SAD

Kardiovaskularne bolesti odgovorne su za više od 800.000 smrtnih slučajeva, hospitalizaciju 6.000.000 bolesnika te se godišnji financijski trošak ovih bolesti u SAD procjenjuje na više od 71 milijarde USD. Većina akutnih kardiovaskularnih događaja pripisuje se tzv. akutnim koronarnim sindromima (engl. *acute coronary syndromes*, ACS), širokom spektru bolesti koji varira od nestabilne angine do infarkta miokarda (engl. *myocardial infarction*, MI). Kongestivno srčano zatajenje (engl. *congestive heart failure*, CHF) pogađa više od 5,3 milijuna Amerikanaca te je odgovorno za oko milijun hospitalizacija i 285.000 smrtnih slučajeva godišnje s godišnjim troškom od 29,6 milijarde USD. Biološki biljezi za ACS i CHF revolucionizirali su dijagnosticiranje, stratifikaciju rizika i obradu navedenih stanja. Ovo predavanje će obrađivati pitanje „predstavlja li primjena bioloških biljega u navedenim stanjima financijsku pogodnost ili teret?“.

Trenutno dostupne smjernice za određivanje bioloških biljega će se primijeniti se za utvrđivanje preporučene primjene bioloških biljega nekroze u bolesnika sa sumnjom na ACS i za određivanja koncentracije BNP ili NT-proBNP u bolesnika sa sumnjom na CHF. Troškovi pretraga koje su u skladu sa smjernicama bit će uspoređeni sa strategijama korištenim prije uspostave ovih smjernicama. Pretpostavljeno je da je trošak određivanja koncentracije troponina i aktivnosti izoenzima MB kreatin-kinaze (CK-MB) 18 USD, te 5 USD za određivanje ukupne aktivnosti kreatin-kinaze (CK). ESC/ACC/AHA/WHF skupina (engl. *Global Task Force*) redefinirala je dijagnozu MI kao otkrivanje povećane i/ili smanjene koncentracije srčanog troponina s barem jednom vrijednosti iznad 99-tog percentila gornje granice referentnog intervala zajedno s pojavom ishemije miokarda. Smjernice NACB preporučaju određivanje koncentracije troponina kod svih bolesnika sa znakovima i simptomima koji se podudaraju s dijagnozom, stratifikacijom rizika od i obradom ACS i MI. U slučaju CHF se preporučuje određivanje koncentracije BNP ili NT-proBNP u akutnoj fazi kako bi se isključila ili potvrdila dijagnoza srčanog zatajenja među bolesnicima s višeznačnim pojavama i simptomima. Prije redefinicije MI i pojave smjernica tri pretrage su bile uobičajene: određivanje koncentracije srčanog troponina, aktivnosti CK-MB i ukupne aktivnosti CK. Prije primjene BNP i NT-proBNP, CHF se dijagnosticirao jedino

S09-2

Biomarkers of acute coronary syndromes and heart failure: Bargain or budget breaker?

Christenson RH

University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA

Cardiovascular disease is the accounts for over 800,000 deaths, 6 million hospitalizations and has an estimated cost of over \$71 billion annually in the US. Most acute cardiovascular events are due to the “acute coronary syndromes” (ACS), a continuum of disease ranging from unstable angina to frank myocardial infarction (MI). Congestive heart failure (CHF), affects over 5.3 million Americans, is responsible for ~1 million hospitalizations and 285,000 deaths each yearly at an annual cost burden of \$29.6 billion. Biomarkers of ACS and HF have revolutionized the diagnosis, risk stratification and management of these conditions. The question to be addressed by this talk is “has utilization of biomarkers been a bargain or a bust in these conditions?”.

Current guidelines for biochemical marker testing will be utilized to identify the recommended use of necrosis biomarkers in suspected ACS patients and for testing BNP or NT-proBNP in suspected CHF patients. Costs for testing in compliance with guidelines will be compared with strategies used prior to establishment of these guidelines. The assumed cost of troponin and CK-MB is \$18, and \$5 for total CK.

The Global Task Force has redefined the diagnosis of MI as detection of the rise and/or fall in cardiac troponin with at least one value above the 99th percentile of the upper reference limit together with evidence of myocardial ischemia. NACB guidelines recommend troponin measurement in all patients having signs and symptoms consistent with ACS for MI diagnosis, risk stratification and management. In the context of CHF, BNP or NT-proBNP testing is recommended in the acute setting to rule out or to confirm the diagnosis of heart failure among patients presenting with ambiguous signs and symptoms. Prior to the MI redefinition and guidelines, three tests were commonly performed: cardiac troponin, CK-MB and total creatine kinase activity. Before availability of BNP and NT-proBNP, CHF was diagnosed using clinical tools alone. A randomized controlled trial compared BNP testing with no BNP testing, finding a significantly shorter hospital stay and savings of about \$1,500 in patients who received BNP testing.

kliničkim sredstvima. U jednom su se randomiziranom kliničkom pokusu usporedile uspostave dijagnoze sa i bez određivanja BNP, a glavni rezultat istraživanja je bilo znatno kraće vrijeme hospitalizacije bolesnika kojima je određen BNP čime se ostvarila ušteda od oko 1.500 USD.

Pod pretpostavkom da 5 milijuna bolesnika određivanje koncentracije troponina čija je jedinična cijena 18 USD, ukupan trošak iznosi 90 milijuna USD. Stoga se može zaključiti da pretrage preporučene u smjernicama potencijalno mogu osigurati uštedu od 135 milijuna USD. Kod određivanja koncentracije BNP moglo bi se uštedjeti 750 milijuna USD, pod pretpostavkom da godišnje 500.000 bolesnika ima višeznačne pojave i simptome CHF. Dakle, primjena srčanih biljega u skladu sa smjernicama predstavlja financijsku pogodnost s mogućom uštedom od 900 milijuna USD godišnje u proračunu američkog zdravstvenog sustava.

e-pošta: rchristenson@umm.edu

Assuming 5 million patients would receive troponin testing at \$18 per test, the total cost is \$90 million. Thus guideline-compliant testing potentially results in a savings of \$135 million. For BNP testing, assuming 500,000 patients per year have ambiguous signs and symptoms of CHF, there is a potential savings of \$750 million. Utilization of cardiac markers in accordance with guidelines is a clearly a bargain and could potentially save the US healthcare \$900 million annually.

e-mail: rchristenson@umm.edu

S09-3

BNP i kardiovaskularni biljezi u hitnoj laboratorijskoj dijagnostici

Dvornik Š

Zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka

Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrtnosti u razvijenim zemljama. Veliki udio svih akutno hospitaliziranih bolesnika čine bolesnici s grudnom boli, a razlikovanje bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (ACS) od onih s nespecifičnom grudnom boli i danas je veliki dijagnostički izazov.

Osnovni patohistološki mehanizam u ACS-u jest nedovoljna opskrbljenost srca kisikom zbog rupture aterosklerotičnog plaka i začepjenja krvne arterije. Vodeći simptom kojim započinje dijagnoza i zatim kaskada terapijskih postupaka jest grudna bol. Na osnovu nalaza elektrokardiograma (EKG) bolesnici se dijele u dvije glavne grupe. Jednu grupu čine bolesnici s karakterističnom grudnom boli kod kojih se uočava elevacija ST-segmenta duža od 20 minuta i koji najčešće imaju potpuno začepjenje koronarne arterije (STEMI). Drugu grupu čine bolesnici s netipičnom grudnom boli kod kojih se ne uočava porast ST-segmenta ili koji uopće niti nemaju promjene u EKG-u (NSTEMI-ACS). NSTEMI-ACS dijagnozu teže je postaviti, njena učestalost je veća, a smrtnost nakon 6 mjeseci može se mjeriti s onom pri STEMI.

S09-3

BNP and cardiovascular markers in emergency laboratory diagnostic

Dvornik Š

Department of laboratory diagnostics, Rijeka Clinical Hospital Centre, Rijeka, Croatia

Cardiovascular diseases are presently the leading causes of death in industrialized countries. Large proportion of all acute hospitalizations are the patients with chest pain, and distinguishing those with acute coronary syndrome (ACS) from all patients with suspected cardiac pain still represents great diagnostic challenge.

The basic pathophysiological mechanism in most ACS is atherosclerotic plaque rupture with differing degrees of thrombosis and distal embolisation, resulting in myocardial underperfusion, ischemia and myocardial cell injury. The leading symptom that initiates the diagnostic and therapeutic cascade is chest pain, but the classification of patients is based on the electrocardiogram (ECG) and there are two categories of patients. In the first group are patients with typical acute chest pain, persistent ST-segment elevation (> 20 min) and probably total coronary occlusion (STEMI). In the second group are the patients with acute chest pain but without persistent ST-segment elevation or no ECG changes at all (NSTEMI-ACS). The diagnosis of NSTEMI-ACS is more difficult to established, it

Posljednjih godina objavljuju se upute za dijagnosticiranje i akutno zbrinjavanje bolesnika s ACS-om kako bi se smanjila smrtnost i troškovi liječenja. Unatoč već prihvaćenim standardima i dalje se ispituje dijagnostička vrijednost novih biljega koji su uglavnom vezani uz ključne patofiziološke faze razvoja ACS-a: oštećenje stanice, upala, aktivacija trombocita, neurohormonalna aktivacija.

Biljezi izbora za postavljanje dijagnoze u hitnoj laboratorijskoj dijagnostici su troponini kao biljezi oštećenja srčanih stanica. Ujedno su najbolji kratkoročni, ali i dugoročni prognostički biljezi i korisni su pri izboru terapije. hsCRP kao biljeg upalne aktivnosti pokazao se kao dobar prognostički biljeg, ali nema važnu ulogu pri postavljanju dijagnoze.

Moždani natrijuretски peptidi (BNP) su biokemijski biljezi vezani uz neurohormonalnu aktivaciju. Pokazatelji su lijeve ventrikularne sistoličke funkcije. U posljednje je vrijeme veliko zanimanje liječnika za određivanje BNP-a u hitnoj laboratorijskoj dijagnostici. Istraživanja pokazuju da je BNP korisan za razlikovanje grudne boli (srčane od ne-srčane dispneje) i da je dobar pokazatelj dugoročne prognoze, ali da ima ograničenu vrijednost kao pokazatelj početnog rizika pa zbog toga i nije koristan pri izboru početne terapijske strategije.

Obzirom na složenost događanja u ACS-u brojne studije ispituju uspješnost istovremene upotrebe nekoliko različitih biljega u postavljanju dijagnoze, određivanju strategije liječenja i za procjenu rizika. Preporučuje se određivanje troponina pri prijemu bolesnika za određivanje početnog rizika, a neposredno zatim određivanje kreatinin klirensa ili cistatina C za procjenu bubrežne funkcije, te BNP-a za procjenu srčane funkcije. Time se može bolje prognozirati uspješnost liječenja i dugoročni ishod bolesti.

Dijagnoza u ACS-u treba biti postavljena što je prije moguće, pa se daje određena prednost point-of-care testovima, posebice ako se rezultat iz laboratorija ne može dobiti unutar 60 minuta. Ovi testovi su jednostavni i brzi, te najčešće i pouzdani.

U otkrivanju novih biokemijskih biljega koji bi pomogli ranijem postavljanju dijagnoze u ACS-u ispituju se biljezi oksidativnog stresa (mijeloperoksidaze), čimbenici upale i tromboze (topivi CD40 ligand), čimbenici rizika disfunkcije endotela (endotelin, adhezijske molekule), kao i čimbenici upale (IL-6, IL-1, TNF-alfa). Ovi biljezi su još uvijek nedovoljno su istraženi i samo pojedinačno opisani u odnosu na patologiju i uspjeh liječenja.

e-pošta: laboratorij@kbc-rijeka.hr

is more frequent than STEMI, and mortality of STEMI and NSTEMI-ACS after 6 months is comparable.

During last years a number of guidelines and recommendations were published in order to help physicians to make decisions in ACS patient management, to prevent mortality and to reduce health care costs. Nevertheless, new studies constantly challenge the current recommendations. A great number of novel biomarkers have been investigated in order to explore their usefulness as diagnostic tools or for risk stratification. All these markers reflect different pathophysiological aspects of ACS as myocardial cell injury, inflammation, platelet activation or neurohormonal activation.

cTnT and cTnI are the preferred markers of myocardial injury. They are the best biomarkers to predict short term (30 days) as well as long-term outcome and they are useful for selecting appropriate treatment. hsCRP is a marker of inflammation, elevated levels are predictive of long-term mortality, but it has no role for diagnosis of ACS.

Brain natriuretic peptides are biochemical markers for neurohumoral activation of heart. They are highly sensitive and specific markers for left ventricular dysfunction. Recently, there is a great interest for emergency determination of BNP. They are helpful in differentiating between cardiac and non-cardiac dyspnoea at hospital admission, and they are markers for long-term prognosis, but have limited value for selecting appropriate treatment and initial risk stratification.

Several studies demonstrated that combined use of markers may significantly help in risk stratification.

Point of care testing (POCT) for biochemical markers in emergency rooms are recommended, since diagnosis in ACS patients should be made as soon as possible. They have to be implemented if central laboratory cannot provide results within one hour. They are easy to perform, results are usually reliable, no special skills are required, but adequate training is necessary.

Among number of novel biomarkers that have been studied during last years there are biomarkers of oxidative stress (myeloperoxidase), marker of inflammation and thrombosis (soluble CD40 ligand), markers of endothelial dysfunction (endothelin and adhesion molecules) and inflammation markers (IL-6, IL-1, TNF-alfa). Their usefulness as diagnostic tools and for risk stratification still has to be established.

e-mail: laboratorij@kbc-rijeka.hr

S09-4

Promjene u metabolizmu lipoproteina u psihijatrijskih bolesnika

Vrkić N

Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Lipidi imaju posebnu važnost za funkciju središnjeg živčanog sustava (mozak sadrži 60% lipida) izgrađujući membrane neurona, sudjelujući u neurotransmisiji te u sustavu drugog glasnika.

Psihijatrijski su bolesnici vrlo heterogena skupina s različitim oblicima poremećenog lipidnog metabolizma. Kod mnogih se zapaža porast tjelesne težine, razvoj metaboličkog sindroma i ubrzana ateroskleroza. Stoga je opravdan interes za lipidni status u krvi kao oružje za procjenu rizika od koronarne bolesti.

U bolesnika koji boluju od shizofrenije, anksioznosti, poremećaja antisocijalne osobnosti, rubnih poremećaja osobnosti, suicidalnog ili agresivnog ponašanja te antisocijalnog ponašanja povezanog s kriminalitetom, nađene su snižene koncentracije kolesterola, apo A-I i HDL-kolesterola a istovremeno povišene vrijednosti homocisteina. I bolesnici muškog spola s depresivnim poremećajem praćenim pokušajima samoubojstva imaju također sniženi sadržaj kolesterola u krvi. Ovakvi nalazi podupiru hipotezu o inverznom ili oštećenom kolesterolskom transportu u bolesnika s velikim depresivnim poremećajem. Sniženi kolesterol mijenja mikroviskoznost neuronskim membranama ili ometa prijenos signala što povećava rizik oboljevanja i ispoljavanja depresije. Citokinska hipoteza pak pretpostavlja patofiziološku podlogu depresije u promjenama na osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda. Utječući na aktivnost lipoproteinlipaze citokini posredno djeluju na metabolizam lipida.

U bolesnika koji boluju od postraumatskog poremećaja nalazimo povišeni kolesterol, LDL-kolesterol, trigliceride, a snižen HDL-kolesterol što se u ukupnosti ogleda u patološkoj vrijednosti indeksa ateroskleroze. U usporedbi sa zdravom populacijom ovi bolesnici imaju visoki rizik za razvoj ateroskleroze i metaboličkog sindroma.

Bolesnike koji boluju od anoreksije nervoze obilježava hiperkolesterolemija i povišena razina LDL-kolesterola. LDL čestice prepunjene su kolesterolom i trigliceridima. Gubitak masnog tkiva uzrokuje povišen sadržaj LDL-kolesterola. Rastuća koncentracija tiroidnog hormona pojačava lipolizu i smanjuje endogeni kolesterol što posljedično smanjuje stanični utrošak LDL čestica, usporava kolesterolski katabolizam i sintezu žučnih kiselina a doprinosi povišenom sadržaju kolesterola u LDL česticama.

Psihijatrijski bolesnici liječeni antipsihoticima ubrzo razvijaju promjene u tjelesnoj konstituciji uz poremećaj me-

S09-4

Lipoprotein metabolism disorders in psychiatric patients

Vrkić N

University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Lipids have several important functions in the central nervous system. They are constituents of the neuronal membrane, play a significant role in the process of neurotransmission and in the second messenger system in the brain.

Psychiatric patients are very heterogeneous group with various type of lipid abnormalities. Most of the patients are under a higher risk for atherosclerosis, metabolic syndrome and weight gain. Estimation of blood lipids and lipoproteins have a great predictive value in determining coronary heart disease risk.

Low concentration of cholesterol, apo A-I and HDL-cholesterol, increased level of homocysteine were found in patients with schizophrenia, anxiety disorders, antisocial personality, borderline personality disorder, suicidal or aggressive behavior as well as in population with antisocial behavior with criminal history. Depressed patients with suicidal attempts have lower serum cholesterol (in men, not in women). This finding support the hypothesis that major depression is accompanied by impaired or reversed cholesterol transport. Low cholesterol level is believed to enhance the risk of depression due to the neuronal dysfunction occurring because of changes in microviscosity of the cellular membrane or disorders in signal transduction. The other, cytokine hypothesis suggests the pathophysiology of depression by means of changes of hypothalamic-adrenal axis as a consequence of the effect of cytokines. Cytokines influence the metabolism of lipids, by means of influencing the effect of lipoprotein-lipase which affects the metabolism of lipids.

Patients with related PTSD (posttraumatic stress disorder) had higher cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides and lower HDL-cholesterol. Atherosclerosis index and established risk factor for atherosclerosis are higher in PTSD than in the health.

Hypercholesterolaemia and elevated LDL-cholesterol is common finding in patients with anorexia nervosa. LDL particles are significantly more enriched in cholesterol and triglycerides. Elevated cholesterol is due to an increase in LDL-cholesterol which is mostly determined by the severe loss of body fat and the resulting changes in thyroid hormones. Hormones increased lipolysis and decreased endogenous cholesterol synthesis with resulting decrease in LDL removal, decrease cholesterol catabolism which contribute to higher LDL-cholesterol and decrease bile acid synthesis.

tabolizma lipida. Antipsihotici povećavaju koncentraciju leptina (hormona koji prvenstveno luče adipociti) koji, kontradiktorno njegovoj fiziološkoj funkciji da inhibira celularni metabolizma lipida, uzrokuje rezistenciju u hipotalamusu što vodi povećanju apetita i tjelesne težine. Nadalje, hiperleptinemija pridonosi rezistenciji na inzulin što povezuje debljinu s inzulinskom rezistencijom. Veliki broj istraživanja potvrđuje da su neke vrste antipsihotika primarno povezane s porastom isključivo triglicerida dok druge uzrokuju i hiperkolesterolemiju i hipertrigliceridemiju. Antipsihotici povećavaju koncentraciju apo A-I što je dio njihovog farmakološkog djelovanja. Kako je u shizofreničnih bolesnika snižena koncentracija apo A-I, to ne čudi da znanstvenici pretpostavljaju povezanost apo A-I s patologijom shizofrenije.

Neke studije izvještavaju čak o mogućoj diferencijalno-dijagnostičkoj ulozi lipida prema kojima bi serumske koncentracije lipida i lipoproteina mogle biti korisni biokemijski biljezi za razlikovanje kliničkih podtipova depresivnih poremećaja.

e-pošta: nvrkic@gmail.com

Altogether, psychiatric patients developed lipid and bodily abnormalities after beginning treatment with antipsychotic drugs. Antipsychotics have the capability to cause an increase in serum leptin levels (hormone that is mainly produced by adipocytes). Leptin may also act on peripheral tissues by inhibiting cellular lipid metabolism. However, obesity in humans is generally associated with high serum leptin levels and a probable leptin resistance in the hypothalamus, resulting in increased appetite and weight. In addition, hyperleptinaemia may alter peripheral insulin resistance and has been suggested to be a link between obesity and insulin resistance. The vast majority of the studies reports concerning some antipsychotics treatment is associated primarily with an increase only in triglyceride and the others show both hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia. Antipsychotic agents increase apoA-I levels as part of their therapeutic actions which suggest that the decreased levels of apoA-I may be associated with the pathology of schizophrenia.

Some studies report differential diagnostics role of lipids. Serum concentrations of lipids and lipoproteins could be intend as biomarkers to differentiate clinical subtypes of depressive disorders.

e-mail: nvrkic@gmail.com

S09-5

Moždani udar – mjesto, uloga i doprinos laboratorijske dijagnostike

Fišić E

Zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka

Moždani udar (cerebrovaskularni inzult, CVI) je naglo nastali fokalni neurološki deficit ili katkad globalni gubitak moždanih funkcija uzrokovan cerebrovaskularnom bolešću. U pravilu nastaje oštećenje djela moždanog tkiva zbog začepjenja krvne žilice u mozgu ugruškom koji prekida cirkulaciju ili zbog pucanja krvne žilice s posljedičnim krvarenjem u mozgu. Vodeći je uzrok smrtnosti i invaliditeta odraslih osoba u Hrvatskoj.

Nakon CVI trećina oboljelih se oporavi do potpune samostalnosti s lakšim posljedicama, kod trećine je posljedica trajna invalidnost, a trećina bolesnika umire. Svaki je moždani udar zaseban, ovisi o mnogim čimbenicima; od toga koja je strana mozga pogođena i koliko, do općeg stanja bolesnika.

Liječenje bolesnika s CVI je složeno i multidisciplinarno. Rana diferencijacija ishemičkog moždanog udara od hemoragijskog neobično je važna zbog akutne terapije,

S09-5

Acute stroke – role of laboratory diagnostic

Fišić E

Department of laboratory diagnostics, Rijeka Clinical Hospital Centre, Rijeka, Croatia

Acute stroke is rapid forming local neurologic lack or sometimes global damage of brain function. It begins with injured part of brain tissue because of blocked brain vein with clog and interruption of circulation or because of cracking vein with bleeding in brain. It is a leading cause of death and disability in Croatia.

After CVI one third of patients get well until complete independently with minor consequence, one third of them have permanent invalidity and one third died in moment of CVI. CVI in every patient is separate, depends on numerous factors, from side of brain which is hit with attack to the general health condition.

Medical treatment of patients with stroke is very complex and multidisciplinary. Early differentiation between ischemic from hemorrhagic stroke is extremely important for acute therapy, subsequent treatment of the patient

kasnijeg tretmana i krajnjeg ishoda. Najvažniji dijagnostički postupci su kompjuterizirana tomografija (CT) i magnetska rezonancija (MR). CT razlučuje hemoragijski od ishemijskog moždanog udara, ali ima i svoja ograničenja: ne vide se rane promjene nakon moždanog udara nakon prvih nekoliko sati, pa se mogu previdjeti rani znakovi ishemije, ili se manje lezije ne prikazuju. Danas se dijagnoza ishemijskog CVI bazira na neurološkom pregledu iskusnih kliničara uz podršku slikovnog prikaza, što često nije dovoljno za postavljanje točne dijagnoze i samim tim započinjanje odgovarajućeg liječenja.

Posljednjih je desetak godina intenzivirano istraživanje biomarkera u krvi ili likvoru koji bi trebali pomoći u dijagnostici moždanog udara i u razlučivanju ishemijskog od hemoragijskog CVI-a. Među brojnim studijama koje su istraživale specifičnost i osjetljivost mogućih biomarkera ispitano je oko 60 pojedinačnih parametara koji mogu biti korisni u kliničkoj praksi. Uglavnom radi se o odabiru biomarkera koji bi ukazivali na oštećenje moždanog tkiva uslijed CVI nakon nekoliko sati i onih koji bi ukazivali na dodatna oštećenja tkiva uslijed zbivanja nakon aktivacije glijne i oštećenja neurona zbog nastale ishemije te onih biomarkera koji bi pomogli u etiologiji moždanog udara. CVI je udružen s povišenjem serumske koncentracije brojnih medijatora upale kao što su interleukin-6 (IL-6), metaloproteinaza matriksa 9 (MMP-9) i adhezijske molekule vaskularnih stanica (VCAM), zatim markera oštećene hemostaze i tromboze kao što je von Willebrand faktor (vWF) i markera oštećenja moždanog tkiva kao što su protein S100 β , mijelinski bazični protein (MBP), neuron specifična enolaza (NSE). Neki od njih (IL-6) rastu unutar prvih nekoliko sati nakon ishemije te koreliraju s veličinom infarkta, ali im manjka specifičnost potrebna za iskoristivost u praksi.

Potruga za brzim serumskim testovima karakterističnim za CVI i dalje ostaje otvorena i važna iako je suočena s brojnim poteškoćama; krvno-moždana barijera usporava oslobađanje proteina iz moždanog tkiva nakon moždanog udara pa se oni pojavljuju u cirkulaciji sa „zakašnjenjem“, mnogi potencijalni markeri cerebralne ishemije i upalnog procesa se nalaze u krvi i u drugim patološkim stanjima koja mogu prikriti CVI (npr. infarkt miokarda ili infekcija mozga), također veličina oštećenog tkiva ne mora korelirati s težinom bolesti (ovisi o dijelu zahvaćenog moždanog tkiva). Druga kategorija poteškoća odnosi se na samu metodologiju; testovi nisu standardizirani i nema zadovoljavajućih kontrola kvalitete. Unatoč poteškoćama, upotrebom kombinacije biomarkera moguće je postaviti upotrebljivu strategiju koja bi poboljšala dijagnostiku CVI-a u akutnoj fazi.

e-pošta: elizabeta.fisic@ri.t-com.hr

and for ultimate outcome. The most important diagnostic procedure for acute stroke are computerized tomography (CT) or magnetic resonance (MRI). CT could distinguish ischemic or hemorrhagic stroke, but interpretation of brain imaging appearances can be difficult, they see the early changes after a stroke in the first few hours, but it can be overlooked early signs if ischemia or smaller lesions are not displayed. Today, the diagnosis of ischemic stroke is based on an experienced stroke clinician's examination of the patient, supplemented by the result of brain imaging (CT). In spite of this, the clinicians are often uncertain whether the diagnosis of stroke is secure enough with the support of image display, which is often not enough to set the correct diagnosis and thus initiate appropriate treatment.

In the last ten years searching for biomarkers in blood or cerebro-spinal fluid has been intensive. Those biomarkers should help in diagnosis of stroke and in distinguishing ischemic from hemorrhagic stroke. Many blood markers, about 60, have been proposed for the diagnosis of stroke in the acute settings. Some of them are highly correlated with stroke: markers of inflammation (matrix metalloproteinase-9: MMP-9, vascular cell adhesion molecule: VCAM, interleukine-6 (IL-6), marker of impaired hemostasis and thrombosis (von Willebrandt factor) a marker of glial activation (S100 β , myelin basic protein: MBP, neuron specific enolase: NSE). Several of these mediators, including IL-6, are elevated within hours after ischemia and correlate with infarct volume, but such inflammatory markers lack the specificity necessary for a useful diagnostic test.

The search for a rapid serum diagnostic tests of ischemic brain injury remains important in the management of acute stroke, although faces difficulties. The blood-brain barrier slows the release of brain tissue proteins into blood, delaying the release of glial and neuronal proteins. Many potential blood markers of cerebral ischemia and inflammation are found in other conditions that may mimic stroke (myocardial infarction, brain infection). Also, the volume of damaged tissue may not correlate with disability (it depends on part of the brain). Another difficulties are in connection with methodological quality (standardization and quality control). In spite of these, using a combination of biomarkers may be a feasible strategy to improve the diagnosis of brain stroke in the acute phase.

e-mail: elizabeta.fisic@ri.t-com.hr

S10 – Laboratorijska medicina temeljena na dokazima**S10-1****Laboratorijska medicina temeljena na dokazima: principi rada**

Christenson RH

Medicinski fakultet Sveučilišta u Marylandu, Baltimore, MD, SAD

Laboratorijska medicina temeljena na dokazima (engl. *evidence based laboratory medicine*, EBLM) osigurava najbolje moguće informacije na temelju kojih se donose odluke. Tehnike EBLM postaju ključan dio rutinskog rada u laboratorijskoj medicini te se temelje na ciklusu od 5 koraka tzv. „A5 ciklus“. Ciklus uključuje 5 važnih koraka: postavljanje pitanja (engl. *ask*), prikupljanje podataka (engl. *acquire*), kritička procjena (engl. *appraise*), primjena (engl. *apply*) i provjera (engl. *audit*). EBLM pristup kroz ciklus omogućava djelovanje u smislu rješavanja svakodnevnih problema.

Proces EBLM započinje postavljanjem kliničkog pitanja. Za oblikovanje pitanja preporuča se korištenje tzv. PICO sustava. PICO je akronim od engleskih riječi bolesnik (engl. *Patient*), intervencija ili pretraga (engl. *Intervention*), usporedba (engl. *Comparator*) i ishod (engl. *Outcome*). Nakon ispravno postavljeno pitanje, PICO sustav omogućava prikupljanje dokaza iz literature koji odgovaraju na postavljeno pitanje. Prikupljanje se može provesti pristupom bazama podataka poput Medline (PubMed), EMBASE ili Cochrane collaboration pomoću računala priključenog na internet. Ključni pojmovi iz pitanja oblikovanog prema PICO sustavu i pomoću Booleovih operatora olakšavaju pretraživanje. Nakon što se ključna literatura i drugi dokazi pronađu, procjenjuju se pomoću podsjetnika. To je nužno kako bi se utvrdilo treba li pronađena informacija biti uključena u odgovaranje na pitanje. Dokazi se mogu primijeniti u praksi prilagođavanjem informacije svakodnevnoj rutini. Ciklus završava provjerom učinka primjene dokaza.

Na primjeru B tipa natriuretskog peptida (BNP) opisat će se proces EBLM i pokazati korisnost A5 strategije u svakodnevnom radu. Krajnji cilj je bolje razumijevanje primjene EBLM u svakodnevnom radu.

*e-pošta: rchristenson@umm.edu***S10 – Evidence based laboratory medicine****S10-1****Evidence-based laboratory medicine: Principles to practice**

Christenson RH

University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA

Evidence Based Laboratory Medicine (EBLM) involves providing the best possible information on which decisions are based. EBLM techniques are becoming an essential part of routine practice in laboratory medicine and are based on the “A5 cycle”. The A5 cycle signifies Ask, Acquire, Appraise, Apply and Audit. This structure will be used to illustrate how the EBLM approach is actionable in everyday problem solving.

The EBLM process begins with ASKING a clinical question, For question formulation use of “PICO”, an acronym which stands for Patient, Intervention (test), Comparator, and Outcome, is recommended. After the question is properly formulated, the PICO format can be used to Acquire the evidence for addressing the question. Acquisition can be performed at any computer connected to the internet through use of databases such as Medline (PubMed), EMBASE or the Cochrane collaboration for searching. Using key terms identified from the formulated PICO question in Boolean strategies facilitates the searching process. After key literature and other evidence are located, available checklists can be used for Appraisal of the evidence. This is necessary to determine if the information found should be included in answering the question. Applying the evidence into practice is possible by adapting the information into the practice environment. An Audit of how use of the evidence performed as expected completes the A5 cycle.

The theme throughout this lecture will involve a clinical problem involving B-type natriuretic peptide to illustrate the EBLM process and demonstrate to attendees how helpful the A5 strategy can be utilized in everyday practice. The overall objective of the session is to have attendees better understand the use of EBLM in their everyday practice.

e-mail: rchristenson@umm.edu

S10-2

Medicina temeljena na dokazima – klinička perspektiva

Matijević R

Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Opća bolnica Sveti Duh, Zagreb

Medicinska praksa zasnovana na dokazima (engl. *Evidence based medicine*, EBM) se definira kao trajni proces učenja koji ujedinjuje moderna medicinska znanja s procesom pružanja zdravstvenih usluga, a sve na dobrobit bolesnika. EBM objedinjuje mogućnost postavljanja kliničkog pitanja u formatu na koji se može naći odgovor u dostupnoj literaturi, znanje pretraživanja literature te adekvatnu procjenu dobivenih informacija. Implementacija EBM u svakodnevnom kliničkom radu korisna je i značajna na više načina. Ona poboljšava njegu bolesnika osiguravajući kvalitetnu i provjerenu skrb i omogućuje izbjegavanje pogrešaka koje mogu biti utužive i pridonosi unaprijeđenju primjenjenih kliničkih postupaka.

Čitav postupak primjene principa EBM sastoji se od 5 koraka:

- 1) Postavljanje pitanja - PICO. Prvi korak u rješavanju kliničkog problema je njegovo definiranje i to prema načelu:

P – pacijent: entitet koji predstavlja ili ima problem

I – intervencija: govori što je učinjeno u pristupu pacijentu

C – usporedba: govori o načinu provođenja istraživanja u svrhu rješavanja problema

O – ishod: rezultat intervencije

- 2) Traženje najboljih dokaza

- 3) Kritička procjena dokaza

- 4) Integracija dokaza i kliničke situacije

- 5) Procjena učinkovitosti, pohranjivanje podataka i rezultata

Problematicu medicine zasnovane na dokazima nemoguće je obrađivati bez spomena Cochrane baze podataka. Ona trenutno djeluje u 91 zemlji a sačinjavaju je: Cochrane Database of Systematic Reviews, Database of Abstracts of Reviews of Effects – DARE, CENTRAL, Cochrane Database of Methodology Reviews, NHS Economic Evaluation Database i Health Technology Assessment Reports. Cochrane Review pruža usluge formuliranja i definiranja pitanja, prepoznavanja i odabira studije, procjenjuje značaj studije, prikuplja informacije koje zatim analizira, prezentira i interpretira kao rezultate. Od izuzetne je važnosti za održavanje nivoa kvalitete informacije činjenica da se podatci redovito obnavljaju.

e-pošta: rmatijev@mef.hr

S10-2

Evidence based medicine - clinical perspective

Matijević R

Medical School, University of Zagreb, Sveti Duh General Hospital, Zagreb, Croatia

Evidence based medicine – EBM is defined as continuous learning process used in order to integrate current medical knowledge into an everyday process of healthcare, both for the benefit of our patients. EBM integrates the process and ability to define clinical question and puts it in the format being suitable to find an answer on it in the available literature. As well as that, EBM concept includes knowledge of the literature search, precise and selective assessment and judgment of information find in the literature. Implementation of EBM into everyday clinical practice is important and useful. It improves the medical care of all patients and it is designed for a specific patient by the process of quality care. It minimizes the risk of medical mistake potentially opening a field of litigation process and finally, improves the use of clinical protocols and guidelines.

The whole process of EBM can be simplified in five steps:

- 1) Asking and defining a clinically important question - PICO. This is a first step in solving a clinical problem. It is based on:

P – patient or entity who had a problem

I – intervention: or what had been done in order to solve the problem in patient or problem approach

C – comparison: defines the way of solving the problem, the way of investigation performed or defined for the purpose of solving a problem

O – outcome: is a result of intervention used in order to assess the benefit or otherwise for specific intervention in order to solve the problem

- 2) Finding the best evidence

- 3) Critical assessment of the evidence found

- 4) Integration of the evidence found and setting the clinical situation and defining a guideline

- 5) Assessment of clinical usefulness, data storage and results assessment

EBM approach and clinical practice based on EBM roles is impossible to explain without mentioning Cochrane collaboration and Cochrane database of systematic reviews. Currently it is present in 91 countries and it includes: Cochrane Database of Systematic Reviews, Database of Abstracts of Reviews of Effects – DARE, CENTRAL, Cochrane Database of Methodology Reviews, NHS Economic Evaluation Database and Health Technology Assessment Reports.

Cochrane Review helps in defining and formulating clinical – important question, helps to find and evaluate the studies used for the further assessment, assesses the quality of the studies, collect information for the further analysis and finally, analyses, presents and interprets the results. It is crucially important for the EBM and for maintaining a quality assessment and control.

e-mail: rmatijev@mef.hr

S10-3

Prenatalni probir sindroma Down - dometi i ograničenja

Kralik Oguić S

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Downov sindrom je najčešći genetski uzrok mentalne zaostalosti. U otprilike 92% svih slučajeva prisutna je trisomija 21. Kad govorimo o prenatalnoj dijagnostici sindroma Down mislimo na invazivne postupke kao što je amniocenteza i biopsija korionskih resica, a koje nose sa sobom rizik raznih komplikacija uključujući i pobačaj. Početkom devedesetih godina prošlog stoljeća počinje razvoj metoda probira koje služe u identifikaciji trudnoća s povećanim rizikom sindroma Down koje je potrebno uputiti na invazivnu dijagnostiku.

Istovremeno opažamo veliki napredak u probiru sindroma Down, ali i sve veći broj žena koje rađaju u starijoj dobi kada se i rizik ovog sindroma povećava. To otežava pravu procjenu koliko su nove metode zaista dovele do napretka.

Prve metode probira koje i danas koristimo su dvostruki (hCG i AFP), trostruki (dodatni biljeg nekonjugirani estriol) i četverostruki (dodatni biljeg inhibin A) testovi u drugom tromjesečju trudnoće (15-22 tjedna). Nešto kasnije pojavili su se kombinirani testovi u prvom tromjesečju (11-14 tjedana). Raznim kombinacijama probira postiže se sve veća osjetljivost (do 95%) i sve manja stopa lažno pozitivnih rezultata (2%). Međutim smjernice se uveliko razlikuju od zemlje do zemlje, a u primjeni su višestruke kombinacije s različitim ishodima. Pojedini stručnjaci smatraju da se nije bitno smanjio broj poroda djece sa sindromom Down, a da se broj pobačaja izazvanih dijagnostičkim zahvatima povećao. Otvara se i pitanje odnosa cijene i korisnosti novih strategija probira.

Obradivši podatke većine velikih studija probira sindroma Down može se sa sigurnošću reći da se uvođenjem kombiniranog probira u prvom tromjesečju i njegovom integracijom s rezultatima iz drugog tromjesečja smanjio broj poroda djece sa sindromom Down i ukupan broj amniocenteza i biopsija korionskih resica. Do danas je dokazano da optimalan test probira u prvom tromjesečju mora uključivati kombinaciju rezultata ultrazvukom izmjerenog nuchalnog nabora i plazmatskog proteina A pridruženog trudnoći (PAPP-A), a da je potpuno svedeno da li će se kao treći biljeg koristiti inhibin A, slobodna beta podjedinica hCG-a ili ukupni hCG. U drugom tromjesečju optimalno je koristiti 4 ili eventualno 3 biljega (bez inhibina-A). U usporedbi strategija kombiniranja testova prvog i drugog tromjesečja najbolji omjer cijene i korisnosti pokazao je kontingentni pristup u odnosu na integrirani i

S10-3

Prenatal screening of Down syndrome

Kralik Oguić S

Clinical Institute for Laboratory Diagnostics, Zagreb Clinical Hospital Centre, Zagreb, Croatia

Down's syndrome is the most common genetic cause of mental retardation. Trisomy 21 is present in approximately 92% of all cases. Prenatal diagnostics of Down's syndrome includes only invasive procedures as amniocentesis and chorionic villus sampling which carry procedure-related risk with miscarriages as the worse. In the early 90's in the last century the development of screening methods started which provided identification of pregnancies with increased risk of Down syndrome necessary to offer prenatal diagnosis.

At the same time a great progress in Down's syndrome screening is detected but also a proportion of women giving birth at older ages. It makes the estimation of efficacy of new screening methods more difficult.

First screening methods in second trimester of pregnancy (15-22 weeks) are still in use: double test (AFP and hCG), triple test (addition of unconjugated estriol) and quad test (addition of inhibin-A). Combined screening test in first trimester (11-14 weeks) came later. With different combinations of screening tests better sensitivity (95%) and lower false positive rate (2%) is achieved. Nevertheless the recommendations are various from country to country and efficacy is different depending on methods used. Some authors claim that the number of births of children with Down's syndrome is not significantly reduced and that even the number of miscarriages induced with invasive diagnostic procedures is growing. There is also a question of cost-benefit ratio of different strategies.

Comparing the data from large population studies we can conclude that the introduction of a combined risk assessment in the first trimester and its integration with second trimester results reduced the number of infants born with Down's syndrome and also the number of chorionic villus samplings and amniocentesis. It is also proved that optimal first trimester screening test combines nuchal translucency and pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A) with the third marker but it is irrelevant whether is it total hCG, free beta-hCG or inhibin A, there is no difference in screening performance. Quad or triple test is the optimal choice for second trimester screening. When comparing cost effectiveness of three different strategies in combining results from first and second trimester screening (integrated test, sequential screening and contingent screening) contingent screening is the

sekvencijalni. U kontingentnom pristupu kombinirani test u prvom tromjesečju dijeli trudnice u tri grupe: visokog, srednjeg i niskog rizika. Ženama s visokim rizikom predlaže se odmah invazivna dijagnostika, nisko rizične se uopće dalje ne testiraju, a one sa srednjim rizikom se šalje na trostruki ili četverostruki test u drugom tromjesečju pa se izračunava integrirani rizik svih biljega.

Zaključno možemo reći da su metode probira sindroma Down danas vrlo djelotvorne, ali ovako velika raznovrsnost izbora i njihove kombinacije zbunjuje i trudnice i liječnike, a i nas u kliničkom laboratoriju na kojima je odluka odabira što od svega toga možemo ili moramo ponuditi.

e-pošta: skralik@kbc-zagreb.hr

S10-4

Racionalno korištenje metaboličkog laboratorija

Fumić K

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Područje nasljednih metaboličkih bolesti brzo se razvija i postavlja sve više zahtjeve pred liječnike, medicinske biokemičare, roditelje, a i cjelokupnu zajednicu koja na njih treba odgovoriti. Za sada je poznat mehanizam nastanka više od 500 nasljednih metaboličkih poremećaja kod kojih se mogu prepoznati promjene na razini metabolita, enzima ili gena. Metabolički laboratoriji za primarno i/ili selektivno traganje za nasljednim metaboličkim bolestima trebali bi odgovoriti izborom najoptimalnijih metoda i postupaka kako za otkrivanje, tako i za praćenje tijeka liječenja velikog broja takvih rijetkih bolesti. Te osobito određuju metaboličke laboratorije neovisno o njihovoj organizaciji. Kako bi se što racionalnije iskoristila laboratorijska oprema i stručni kadar, te tako omogućila savjesna primjena najboljih dokaza za donošenje odluka u dijagnostici i liječenju određenog bolesnika s nasljednom metaboličkom bolesti, preporuka je da jedan metabolički laboratorij pokriva potrebe stanovništva od oko 4.000.000 stanovnika.

Kontinuirana edukacija treba olakšati manje upućenim liječnicima odabir metaboličkih pretraga sa svrhom što ranijeg otkrivanja metaboličkih bolesti, što je preduvjet njihovog uspješnog liječenja i smanjenje broja nepotrebnih pretraga koje značajno otežavaju rad metaboličkog laboratorija. Naime, iako je velik broj normalnih nalaza jedna od uobičajenih karakteristika takvih laboratorija, potreb-

preferred option. In contingent screening the first trimester results are used to categorise women as high, intermediate or low risk. High risk women are offered early diagnosis, low risk women do not go second trimester testing and intermediate risk women are offered second trimester testing.

We can conclude that screening methods of Down's syndrome provided today are very effective but variety of choices is too big. It is confusing for both patients and doctors but also for us who work in clinical laboratory when we have to define which type of tests will be included in screening we can offer.

e-mail: skralik@kbc-zagreb.hr

S10-4

Rational use of the metabolic laboratory

Fumić K

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of Medicine and Clinical Hospital Center, Zagreb, Croatia

The area of hereditary metabolic diseases develops quickly and sets even higher demands to physicians, medical biochemists, parents and the whole community that has to respond to them. Up to now we are familiar with the mechanism of development of more than 500 hereditary metabolic disorders where one can recognize changes on the level of metabolites, enzymes or genes. Metabolic laboratories for primary and/or selective search for hereditary metabolic diseases should respond with an array of the most optimal methods and procedures for detecting a disease as well as for treatment monitoring of a great number of such rare diseases. Those characteristics determine metabolic laboratories independently of their organization. In order to use the laboratory equipment and professional staff as rational as possible and thus to enable conscientious application of the best evidence for decision making in diagnostic and treatment of a certain patient with a hereditary metabolic disease, it is recommended that one metabolic laboratory covers needs of 4,000,000 citizens.

Continuous education should ease a choice of metabolic tests to less informed physicians with the aim of the earliest possible detection of a metabolic disease, what is also a precondition for a successful treatment and a decrease in number of unnecessary tests that make the work of a metabolic laboratory significantly complicated.

no je što bolje postaviti indikacije za pojedine pretrage. Jedno od načela koje bi liječnici trebali usvojiti u slučajevima kad bolesnik nije ugrožen je odabir najprije onih pretraga koje mogu otkriti lječive ili češće bolesti, pa tek ukoliko se te ne otkriju, tražiti rijetke i neliječive.

Takav način rada podrazumijeva aktivnu suradnju liječnika s medicinskim biokemičarima, što je preduvjet racionalnog korištenja metaboličkog laboratorija.

e-pošta: ksenija.fumic@zg.htnet.hr

Although a great number of test results presents one of the usual characteristics of such laboratories, it is necessary to set the indications for certain tests as well as possible. One of the principles that should be adopted by physicians in cases when patient's life is not in danger is first to choose those tests that can detect curable and more common diseases. Only after they are not detected one should search for rare and incurable diseases. Such way of work requires and understands active physician's cooperation with medical biochemists, what represents a prerequisite for rational utilization of metabolic laboratory.

e-mail: ksenija.fumic@zg.htnet.hr

S10-5

U traganju za idealnim pokazateljem kontrole glikemije

Vučić Lovrenčić M

Sveučilišna klinika za dijabetes, endokrinologiju i bolesti metabolizma
Vuk Vrhovac, Zagreb

Neprijeporno je dokazano da je dobra kontrola glikemije ključni preduvjet za sprečavanje razvoja kroničnih komplikacija šećerne bolesti. Međutim, praćenje i procjena kontrole glikemije još uvijek su predmetom brojnih kontroverzi. Unatoč tehnološkom napretku i dobroj edukaciji, rezultati samomjerenja glukoze u plazmi koje pomoću glukometara provode oboljeli od šećerne bolesti još uvijek nisu dovoljno pouzdani. Kontinuirano mjerenje glukoze u plazmi pomoću potkožnih senzora nije široko dostupno radi visoke cijene, a interpretacija rezultata zahtijeva dodatna istraživanja utemeljena na dokazima.

Stoga je laboratorijsko mjerenje hemoglobina A1c i dalje nezaobilazni čimbenik kontrole i kliničkog praćenja šećerne bolesti. Potreba za harmonizacijom hemoglobina A1c dovela je do kontroverznog ishoda: NGSP sustav standardizacije osigurava sljedivost rezultata prema ključnim kliničkim studijama utemeljenim na dokazima gdje je utvrđena veza između razine glikemije izražene preko hemoglobina A1c i rizika za razvoj kroničnih komplikacija šećerne bolesti; IFCC sustav standardizacije osigurava sljedivost prema referentnoj analitičkoj metodi, ali su radi specifičnosti metode rezultati značajno niži, što bi prema interpretaciji kliničkih diabetologa moglo dovesti do pogrešaka u liječenju i ozbiljno ugroziti skrb o oboljelima od šećerne bolesti.

Ovaj prijedor doveo je do ideje jedne temeljite revalorizacije hemoglobina A1c, na način da se pribave prošireni

S10-5

In search of an ideal glycemic control indicator

Vučić Lovrenčić M

Vuk Vrhovac University Clinic for Diabetes, Endocrinology and Metabolic Diseases, Zagreb, Croatia

There is plenty of evidence implicating tight glycemic control as a key-postulate for prevention of chronic diabetic complications. However, monitoring and assessment of glycemic control is still controversial. Despite advances in technology and patient education, results of self-control glucose monitoring performed by the diabetic patients are still uncertain. Continuous subcutaneous glucose monitoring by the use of appropriate sensors is limited in use because of high costs, and accurate result interpretation needs additional evidence-based studies.

Thus, laboratory measurement of hemoglobin A1c remains an inevitable factor in the control and clinical monitoring of diabetes mellitus. A need for harmonization of hemoglobin A1c lead to a controversial outcome: NGSP-standardization system enabled traceability of results to the landmark clinical evidence-based studies with established correlation between glycemic control, expressed as hemoglobin A1c and risk for development of chronic diabetic complications; IFCC-reference system enables traceability to the analytical reference method, giving significantly lower results due to its specificity which, according to the interpretation of clinical diabetologists might lead to the treatment errors and serious deterioration in the care for diabetic patients.

This controversy resulted into idea of a complete revalorization of hemoglobin A1c in terms of obtaining extended evidence of its correlation with an average glycemia, wi-

dokazi o njegovoj korelaciji s prosječnom glikemijom, koji bi u konačnici omogućili izražavanje rezultata hemoglobina A1c u obliku ekvivalenata prosječne glikemije. Iako su rezultati multicentričnog istraživanja potvrdili korelaciju i osigurali dovoljno podataka za matematičku konverziju hemoglobina A1c (%) u ekvivalente prosječne glikemije (mmol/l), značajan rasap vrijednosti uočen već u kontroliranoj populaciji pacijenata uključenih u istraživanje, čine primjenu ovog modela u općoj populaciji upitnom. Stoga će tek daljnja istraživanja omogućiti odabir idealnog pokazatelja kontrole glikemije.

e-pošta: vucic@idb.hr

th an ultimate goal of expressing hemoglobin A1c results as equivalents of average glycemia. Albeit respective multicentric study results confirmed correlation and ensured enough data for the mathematical conversion of hemoglobin A1c (%) into derived average glycemia equivalents (mmol/l), a significant dispersion of values in the controlled study population made extrapolation of this model to the general population questionable. Thus, further research is needed to provide choice for an ideal indicator of glycemic control.

e-mail: vucic@idb.hr



diagnostico
skalpeli

Ljudevita Juraka 24 - 10090 Zagreb

Tel. 01 377 84 84 - Fax. 01 377 85 58

e-mail: skalpeli@skalpeli.hr - www.skalpeli.hr

HumaStar 600

Automatski analizator za kliničku kemiju

BRZ

- do 600 testova/h, maks. 770 testova/h sa ISE
- hladena komora za 48 reagensa
- 5 stalaka za 95 uzoraka, uključujući STAT
- 160 reakcijskih kiveta u dva odvojena reakcijska područja



JEDNOSTAVAN

- barkodirani Human sistemski reagensi (4 otvorena kanala)
- ISE modul za Na, K, Cl
- automatsko razrjeđivanje
- operativni program koji se temelji na Windows XP i Vista



EKONOMIČAN

- velika stabilnost reagensa u analizatoru
- reakcijske kivete za višekratnu upotrebu
- potrošnja vode: 4L/sat
- LIS sučelje



Human

Diagnostics Worldwide

Ortho Clinical Diagnostics
a **Johnson-Johnson** company

Novo!

VITROS[®] System 3600
Immunodiagnostic



Novo!

VITROS[®] Integrated 5600



MicroWell™



Intellicheck®



MicroSensor™



MicroSlide™



MicroTip™

***Vaši
nalazi
mijenjaju
živote pacijenata.***

***Iza toga
stoje naši analizatori.***

MEDITRADE H

Črnomerec 31a, 10000-Zagreb, Hrvatska
Tel. +385 1 33 89 931, Fax. +385 1 33 89 939
milka.kasal@meditrade-h.hr

ZR1 – Toksikologija

ZR1-1

Validacija kvalitativnih kromatografskih metoda

Samošćanec K

Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Validacija je postupak ispitivanja pouzdanosti, točnosti i preciznosti metode. Ona je važan element svih metoda mjerenja pošto je usko povezana sa kvalitetom dobivenih rezultata. Mjerne metode karakteriziraju parametri kojima se procjenjuje analitička prihvatljivost. Oni moraju biti u skladu s prethodno definiranim zahtjevima. Svi parametri ovise o tipu i karakteristikama same metode. Konvencionalna klasifikacija metode dijeli na kvalitativne i kvantitativne. Prema definiciji kvalitativne metode su analize čiji odgovor je prisutnost ili odsutnost analita koji se mjeri bilo direktno, ili indirektno u točno određenoj količini uzorka. Rezultat se dobiva očitanjem signala mjerenja, uspoređivanjem odgovora na referentnu ili dogovornu vrijednost. Rezultat je binaran (da/ne; prisutan/odsutan). Referentni materijal može biti vanjski ili unutarnji. Vanjski referentni materijal je dobro karakteriziran (certificirani referentni materijal), dok unutarnji referentni materijal može biti ili dobro obrađen uzorak poznatih vrijednosti ili komercijalan uzorak koji se nalazi u komercijalnim pakiranjima testa.

Kvalitativni parametri se moraju pažljivo prepoznati i odabrati prema zahtjevima metode. Oni su uključeni u pojedinosti koje su povezane s informacijama koje želimo dobiti: verifikacija sljedivosti, određivanje netočnosti povezane s rezultatom (lažno pozitivni/lažno negativni), osjetljivost i specifičnost, selektivnost: interferencije, granica detekcije, područje nepouzdanosti i robusnost metode.

Sljedivost prema definiciji Eurachema je svojstvo rezultata mjerenja ili vrijednosti standarda koje su povezane s referentnim materijalom, obično nacionalnih ili internacionalnih standarda, putem neprekidnog niza uspoređivanja. Odnosno, sljedivost možemo procijeniti uspoređivanjem rezultata dobivenih ili referentnom metodom ili korištenjem referentnog materijala.

U okvirima kvalitativne analize osjetljivost i specifičnost predstavljaju sposobnost testa za razlikovanje stvarno pozitivnih (osjetljivost) od stvarno negativnih (specifičnost) uzoraka. Visoka osjetljivost i specifičnost nekog testa osigurava izbjegavanje lažnog rezultata. Mora se voditi računa o selektivnosti koja je usko povezana sa speci-

ZR1 – Toxicology

ZR1-1

Validation of qualitative chromatography methods

Samošćanec K

University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Validation is a procedure of testing the reliability, accuracy and precision of a method. Being closely related to the quality of the results obtained, it is an important element of all methods of measurement. These methods are characterized by parameters evaluating analytical acceptability, which should be in agreement with the previously defined requirements. All these parameters depend on the type and characteristics of the method. Methods are conventionally classified into qualitative and quantitative methods. By definition, qualitative methods include those analyses that point to the presence or absence of the analyte measured directly or indirectly in a strictly defined sample quantity. The result is obtained by reading off the measurement signal and comparing it with the reference or predetermined value. The result is binary (yes/no; present/absent). The reference material may be external or internal. External reference material is well characterized (certified reference material), whereas internal reference material may be a properly processed sample of known values or a commercial sample found in commercial test kits.

Qualitative parameters should be carefully identified and chosen according to the method requirements. They are substantial for the information to be obtained, e.g., verification of traceability, determination of result related inaccuracy (false positive/false negative), sensitivity and specificity, and selectivity: interferences, detection limits, unreliability area, and method robustness.

According to Eurachem definition, traceability is a characteristic of the measurement result or standard value related to reference material, usually national or international standards, through a continuing sequence of comparisons. This means that traceability can be assessed by comparison of results obtained by the reference method or by use of the reference material.

In qualitative analysis, sensitivity and specificity represent the test potential to differentiate true positive (sensitivity) from true negative (specificity) samples. High test sensitivity and specificity ensure false results to avoid. Selectivity should also be taken in consideration, as it is closely related to specificity and false positive results. Poor

fičnošću i lažno pozitivnim rezultatima. U slučaju utjecaja reagensa i matriksa uzorka govorimo o slaboj selektivnosti samog testa: što je viša selektivnost to je veća vjerojatnost identificiranja analita u uzorku. Proizvođač je također obavezan objaviti spisak kemijski sličnih supstancija koje ne izazivaju križne reakcije.

Kako je rezultat kvalitativne metode binaran, parametar mjerne nesigurnosti u kvantitativnim analizama je zamenjen sa područjem nepouzdanosti u kvalitativnim analizama jer bolje opisuje područje u kojem postoji veća vjerojatnost pogreške. U kvalitativnim testovima s uzorkom poznate koncentracije (kalibrator/kontrola) najbolje se definira područje oko granične vrijednosti (*cut-off*; COV). Područje nepouzdanosti se definira dobivenim parametrima osjetljivosti i specifičnosti. Broj lažno (+) pozitivnih i lažno (-) negativnih rezultata možemo procijeniti modifikacijom COV, tj. smanjiti broj lažno (-) negativnih rezultata smanjenjem COV, odnosno smanjiti broj lažno (+) pozitivnih povećanjem COV. Robusnost je osnovno analitičko svojstvo kojim je opisana postojanost binarnog rezultata u odnosu na neznatne promjene eksperimentalnih uvjeta (promjena količine uzorka, pH, vremena izvođenja, temperature, postotka otapala i slično).

e-pošta: ksamosc1@gmail.com

test selectivity implies the impact of reagent and sample matrix, i.e. the higher the selectivity, the greater the likelihood of analyte identification in the sample. The manufacturer is also obliged to provide a list of chemically similar substances that do not induce cross reactions.

As the result of a qualitative method is binary, the parameter of measuring uncertainty in quantitative methods is substituted by the area of unreliability in qualitative analyses because it better describes the area with a higher probability of error. In qualitative tests with a sample of known concentration (calibrator/control), the area around borderline value (*cut-off*, COV) is best defined. The area of unreliability is defined by the sensitivity and specificity parameters obtained. The number of false (+) positive and false (-) negative results can be evaluated by modifying COV, i.e. reducing the number of false (-) negative results by COV decrease, or reducing the number of false (+) positive results by COV increase. Robustness is a basic analytical characteristic describing the stability of binary result against slight changes in experimental conditions (change in sample quantity, pH, time of performance, temperature, solvent percent, etc.).

e-mail: ksamosc1@gmail.com

ZR1-2

Validacija kvantitativnih kromatografskih metoda

Granić P

Zavod za farmakokinetiku i analitičku toksikologiju, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Kromatografske se metode često koriste za kvantitativne i kvalitativne analize lijekova, produkata lijekova i spojeva u biološkim tekućinama.

Validacija metode je proces kojim se metoda provjerava od strane onog tko ju je razvio ili od strane korisnika. Metode su ponovljive kada ih koriste i drugi analitičari na drugoj jednako vrijednoj opremi, u drugo vrijeme ili na drugoj lokaciji. Postupak validacije može biti učinjen u početku razvojnog ciklusa, ali može ići i dalje u obliku revalidacije ukoliko dođe do promjena u metodi.

Parametri validacije kvantitativnih kromatografskih metoda su: točnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, linearnost, preciznost, obnovljivost, pouzdanost, stabilnost supstance, analitička specifičnost/selektivnost.

e-pošta: pgranic@kbc-zagreb.hr

ZR1-2

Validation of quantitative chromatographic methods

Granić P

Division of pharmacokinetics and analytic toxicology, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Chromatographic methods are commonly used for the quantitative and qualitative analysis of drug substances, drug products and compounds in biological fluids.

Validation of a method is the process by which a method is tested by the developer or user. Methods should be reproducible when used by other analysts, on other equivalent equipment, on other days or locations. The process of validation should be early in the development cycle, but validation should be continued form of revalidation with method changes.

Parameters for validation of quantitative chromatographic method are: accuracy, detection limit and quantitation limit, linearity, precision, reproducibility range, recovery, sample solution stability, specificity/selectivity.

e-mail: pgranic@kbc-zagreb.hr

ZR1-3

Mjerna nesigurnost i validacija metoda

Gašljević V

Hrvatsko mjeriteljsko društvo, Zagreb

U današnjemu globalnome svijetu važnost točnih, pouzdanih i usporedivih mjernih rezultata od vitalnog je značaja. Stoga i norme koje propisuju zahtjeve na rad laboratorija (ISO/IEC 17025, ISO 15189) traže mjeriteljski pristup procesu mjerenja, zahtijevajući validaciju/verifikaciju metoda, osiguranje mjeriteljske sljedivosti, poznavanje mjerne nesigurnosti, praćenje trendova u mjernim procesima i sl.

Donošenje ispravne odluke je li neka metoda prikladna za određenu svrhu (validacija) kao i realno procjenjivanje mjernih nesigurnosti mogući su samo uz dobro poznavanje mjernih procesa. „Dobrotu“ mjernog procesa određuje iznos slučajnih i sustavnih pogrešaka. Eksperimenti koje provodimo u svrhu validacije metode mogu dati dobar uvid u njihovu veličinu, ali i izvore pa stoga mogu poslužiti i pri procjenjivanju mjernih nesigurnosti. U ovome članku opisano je kako ciljana mjerna nesigurnost može utjecati na postavljanje kriterija na parametre pri validaciji metode kao što su: ponovljivost mjerenja, intermedijarna preciznost (međupreciznost), sustavna pogreška (iskorištenje) te na koji način rabiti validacijske eksperimente za procjenjivanje mjernih nesigurnosti rezultata.

e-pošta: visnja.gasljevic@hmd.t-com.hr

ZR1-4

Statistička obrada validacija u analitičkoj toksikologiji

Nikolac N

Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Validacija analitičkog postupka u laboratoriju uključuje potvrđivanje netočnosti, nepreciznosti, linearnosti, utjecaja interferencija, te ukoliko je u laboratoriju prisutan paralelni analitički sustav, njihovu međusobnu usporedbu. Mjerenje netočnosti uključuje usporedbu rezultata mjerenja sa poznatim ciljnim vrijednostima. Rezultat se izražava kao postotak odstupanja (engl. *bias*) i ukazuje na postojanje sustavne pogreške. Test iskorištenja (engl. *recovery test*) kao mjera točnosti ispituje postojanje propor-

ZR1-3

Measurement uncertainty and method validation

Gašljević V

Croatian Metrology Society, Zagreb, Croatia

In today global world accurate, reliable and traceable measurement results are of vital importance. Therefore, the standards for laboratories like ISO/IEC 17025 and ISO 15189 demand a metrological approach to measurement processes requiring validation/verification of methods, assurance of metrological traceability, knowledge of measurement uncertainty, monitoring of trends etc.

Making the right decision on whether or not a method is adequate for a stated use (validation), as well as a realistic estimation of measurement uncertainty are only possible when a measurement process is well known. Its 'goodness' is characterized in terms of the random and systematic errors that affect the measurements. Experiments conducted in order to validate a method can give good insight into their magnitude and also into their sources and therefore can be used for measurement uncertainty estimation. This article describes how target measurement uncertainty can affect the establishment of the validation criteria on method parameters like: repeatability, intermediate precision, bias and how to use validation experiments for measurement uncertainty estimation.

e-mail: visnja.gasljevic@hmd.t-com.hr

ZR1-4

Statistical analysis in validation of methods in analytical toxicology

Nikolac N

University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Laboratory validation of analytical procedures includes confirmation of inaccuracy, imprecision, linearity, interferences and method comparison, if a parallel system is already present in the laboratory.

Inaccuracy is expressed as percentage of deviation (bias) and includes comparison of results with known target values. Bias is a measure of systematic error. Recovery test discovers proportional systematic errors by measuring samples spiked with increasing known amount of analyte.

cionalne sustavne pogreške dodavanjem poznate količine mjernog analita u uzorak.

Nepreciznost se ispituje ponovljenim mjerenjima unutar serije i između serija. Kao rezultat se za kvantitativne metode izražava srednja vrijednost, standardna devijacija i koeficijent varijacije, a za kvalitativne postotak rezultata koji odstupaju od najčešće dobivene vrijednosti. Ispitivanje nepreciznosti otkriva postojanje slučajnih pogreški.

Potvrđivanje linearnosti (samo za kvantitativne metode) uključuje mjerenje različitih koncentracija dobivenih razrjeđivanjem uzoraka, kako bi se odredio raspon koncentracija unutar kojih rezultati pokazuju linearnu međuovisnost. Podaci se analiziraju linearnom regresijom i izračunavaju se koeficijent regresije i koeficijent determinacije. Međutim, u nekim slučajevima koeficijent determinacije može biti vrlo visok (0,98), a da ovisnost nije linearna nego zvonolika, što se može uočiti prikazom reziduala.

Rezultate usporedbe dvaju paralelnih analitičkih postupaka za kvantitativne metode najčešće prikazujemo Bland-Altmanovim grafikonom i Passing-Bablok regresijom.

Postoji nekoliko načina prikaza Bland-Altmanovog grafikona, a najčešće se na apscisu nanose srednje vrijednosti mjerenja analita u uzorku dvjema metodama, a na ordinatu razlika između dva mjerenja. Ukoliko se sva mjerenja nalaze unutar $\pm 1,96$ SD, metode su podudarne. Ovaj je prikaz pogodan za otkrivanje sistemске pogreške i vrijednosti koje znatno odstupaju (engl. *outlier*).

Passing-Bablok regresija je statistički postupak usporedbe dviju varijabli, kada nije poznato koja je varijabla zavisna, a koja nezavisna. Kao rezultat izračunava se jednadžba pravca, koja je definirana koeficijentom smjera i odsječkom na osi x uz pripadajuće intervale pouzdanosti. Vrijednosti intervala pouzdanosti izuzetno su važne za interpretaciju rezultata: ako interval pouzdanosti za odsječak na osi x ne obuhvaća nulu, znači da postoji stalna razlika u mjerenjima između dviju metoda; ako interval pouzdanosti koeficijenta smjera pravca ne obuhvaća jedinicu, postoji proporcionalna razlika u mjerenjima. Također je potrebno izračunati i Pearsonov koeficijent korelacije (r). Treba imati na umu da je interpretacija koeficijenta korelacije različita u odnosu na korelacije u biološkim sustavima pa za zadovoljavajuću korelaciju dviju metoda koeficijent korelacije treba biti barem 0,95.

Ukoliko se radi međusobna usporedba dviju kvalitativnih metoda, prikaz i obrada rezultata znatno su jednostavniji. Stupanj slaganja se prikazuje kao postotak mjerenja u kojima je dobiven isti rezultat objema metodama.

Specifičnosti analitičke validacije kromatografskih metoda osim standardnih parametara uključuju određivanje i nekih dodatnih specifičnih parametara: selektivnosti, raspona mjerenja, granice kvantifikacije (engl. *limit of quantitation*, LOQ), granice detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) i robusnosti metode.

Imprecision is determined by repeated within-run and between run measurements. For the quantitative methods, mean, standard deviation and coefficient of variation are calculated and for the qualitative methods, percentage of results that deviate from the most common result. Imprecision measurement reveals the existence of random errors.

Linearity confirmation (for quantitative methods) includes dilution measurements in order to determine concentration range with linear dependence. Results are analyzed with linear regression and coefficients of regression and determination are calculated. However, in some cases, very high coefficients of determination (0.98) could be obtained, but the dependence is not linear but curved, which could be established by calculating residuals.

Comparison of two parallel analytical procedures for quantitative methods is analyzed with Bland-Altman graph and Passing-Bablok regression.

There are several ways of presenting Bland-Altman graph. In the most commonly used approach mean values of two measurements on x-axis are plotted against the differences of two measurements on y-axis. If all measurements are within ± 1.96 SD, there is a good conformance between methods. This type of graph is suitable for detecting systematic errors and outliers.

Passing-Bablok regression is a statistical procedure for comparison of two variables in cases when it is not known which variable is dependent and which one is independent. As a result, line equation is calculated, with slope and intercept and their corresponding confidence intervals (CI). Confidence intervals are extremely important for interpreting results: if CI for intercept doesn't include value 0, there is a constant difference between measurements. Also, if CI for slope doesn't include value 1, there is a proportional difference between measurements.

Also, Pearson's coefficient of correlation should be calculated. Interpretation of correlation coefficients in analytical validation is different than in biological systems. For acceptable correlation, coefficient of correlation should be at least 0.95.

Comparison of two qualitative methods is much simpler: result is expressed as a percentage of measurements in which the same result is obtained.

Validation in analytical toxicology also includes some specific parameters: selectivity, range of measurements, limit of quantitation, limit of detection and robustness.

e-mail: nora.nikolac@gmail.com

e-pošta: nora.nikolac@gmail.com

ZR2 – Kontrola kvalitete: Vanjska procjena kvalitete rada medicinsko-biokemijskih laboratorija u Hrvatskoj

ZR2-1

Humana svježa krv kao uzorak u vanjskoj procjeni rada

Nazor A¹, Juretić D²

¹Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

²Hrvatsko društvo medicinskih biokemičara, Zagreb

Cilj vanjske kontrole kvalitete je osigurati objektivnu, neovisnu procjenu hematoloških rezultata i utvrditi stupanj međulaboratorijske usporedivosti na nacionalnoj razini, što je osnova za harmonizaciju hematoloških nalaza.

Činjenica da se u dvjestotinjak laboratorija koristi 37 tipova brojača od 11 proizvođača postavlja problem kontrolnog uzorka. U području laboratorijske hematologije ne postoji sljedivost prema kalibratoru, što upućuje da se ne može proizvesti apsolutno prikladan kontrolni uzorak za sve analitičke sustave. Do sada se koristio komercijalni pripravak krvi koji nije bio primjenjiv na sve hematološke brojače, pogotovo ne u postupku diferenciranja leukocita (3-dijelna i 5-dijelna diferencijalna krvna slika), što su potvrdili dosadašnji rezultati u vanjskoj procjeni kvalitete rada u Hrvatskoj.

Prema preporukama EQALM-a (engl. *European Conference on Quality Assessment in Laboratory Medicine*) najbolji uzorak je svježa ljudska krv.

U skladu s tim preporukama, ali i temeljem dobrih iskustava u provođenju programa procjene kvalitete rada u laboratorijskoj hematologiji u drugim državama, ostvarena je suradnja s Hrvatskim zavodom za transfuzijsku medicinu za proizvodnju humanog kontrolnog uzorka svježe krvi.

Kontrolni uzorci bi, kao humani materijal, trebali biti apsolutno primjenjivi na sve hematološke analitičke sustave i za sve hematološke pretrage koje se dobivaju sa brojača.

Time bi se zadovoljili ciljevi analitičke kvalitete za hematološke brojače koji su definirani međunarodno prihvaćenim standardima i obuhvaćaju sve parametre kompletne krvne slike.

e-pošta: aida.nazor@gmail.com

ZR2 – Quality control: External Quality Assessment program for medical biochemistry laboratories in Croatia

ZR2-1

Fresh human blood as a control sample in EQA

Nazor A¹, Juretić D²

¹Institute of Clinical Chemistry, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

²Croatian Society of Medical Biochemists, Zagreb, Croatia

The aim is to ensure an objective, independent evaluation of haematological results and determine the degree of interlaboratory comparability on the national level which is the basis for harmonization of haematological results.

The fact that 37 various types of counters from different 11 manufacturers are used in more than 200 laboratories becomes the problem for defining the control sample. The area of laboratory haematology lacks the traceability according to the calibrator, which implies that an absolutely adequate control sample can not be produced for all of the analytical systems. To date, a commercial blood preparation has been used which was not applicable to all haematological counters, especially not in the process of differentiation of leucocytes (3-part and 5-part leucocytes differential) which was confirmed by the results in the external quality assessment in Croatia.

According to the recommendations made by EQALM (European Conference on Quality Assessment in Laboratory Medicine), the fresh human blood serves as the best control sample.

Following this recommendation and good experiences in conducting the assessment program in laboratory haematology in other countries a cooperation is established with Croatian Institute for Transfusion Medicine for preparation of control samples from fresh human blood.

The control samples, as a material made from humans, should be applicable to all of the haematological analytical systems and to all haematological examinations done by the counters.

That would satisfy the aims of analytical quality for haematological counters, defined by the internationally accepted standards in which include all parameters of CBC and leukocytes differential.

e-mail: aida.nazor@gmail.com

ZR2-2

Usporedba rezultata dobivenih za pH, plinove i ionizirane elektrolite u kontrolnom i arterijskom modu

Perkov S

Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

U okviru nacionalnog programa vanjske procjene kvalitete pH, plinovi i ionizirani elektroliti određuju se u 45 medicinsko-biokemijskih laboratorija na različitim acidobaznim analizatorima uključujući RapidLab 248/348 2160/2165, Bayer diagnostics (N = 32), IL Gem Premier 3000, Instrumentation Laboratories (IL) (N = 6), Stat Profile pHox Plus/Crital Care Xpress, Nova Biomedical (N = 2), AVL OPTI 1/AVL 995, AVL Scientific Corporation (N = 2), Omni S, Roche diagnostics (N = 1), GASTAT 602i, Techno Medica Co, Ltd. (N = 1) i Ecosys II, Eschweiler GmbH&CoKG (N = 1).

U svrhu procjene usporedivosti rezultata komercijalnih kontrolnih uzoraka u kontrolnom i arterijskom modu obrađeni su rezultati ciklusa 3/2008. Samo 27 laboratorija poslalo je rezultate u oba moda. Rezultati su obrađeni bez obzira na metodu i prema metodi za Bayerove (N = 19) i IL-ove analizatore (N = 4). Studentov t-test primijenjen je za procjenu razlika između rezultata u kontrolnom i arterijskom modu, uz razinu značajnosti $P < 0,05$.

Statistički značajna razlika u kontrolnom i arterijskom modu nađena je za parcijalni tlak ugljičnog dioksida bez obzira na metodu ($P = 0,001$) i prema metodi za Bayerove analizatore ($P < 0,001$), te za pH prema metodi za Bayer-ove analizatore ($P = 0,022$).

Obzirom na različite algoritme koje se primjenjuju u različitim tipovima acidobaznih analizatora za izračun pH, plinova u krvi i ioniziranih elektrolita u komercijalnim kontrolnim otopinama koje se svojim sastavom značajno razlikuju od humanih uzoraka, preporuka je da se komercijalni kontrolni uzorci analiziraju sukladno uputama proizvođača acidobaznog analizatora.

e-pošta: sonja.perkov@hdmh.hr

ZR2-2

Comparison studies of pH, gas and ionised electrolytes in control and arterial mode

Perkov S

Institute of Clinical Chemistry, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

In scope of the national program of external quality assessment pH, blood gases and ionized electrolytes are determined by 45 medical-biochemistry laboratories on different blood gas analyzers including RapidLab 248/348 2160/2165, Bayer diagnostics (N = 32), IL Gem Premier 3000, Instrumentation Laboratories (IL) (N = 6), Stats Profile pHox Plus /Crital Care Xpress, Nova Biomedical (N = 2), AVL Opti 1/AVL 995, AVL Scientific Corporation (N = 2), Omni S, Roche diagnostics (N = 1), GASTAT 602i, Techno Medica Co., Ltd. (N = 1) and Ecosys II, Eschweiler GmbH & CoKG (N = 1).

Results of the cycle 3/2008 were processed for comparability evaluation of results of commercial control samples in control and arterial mode. Only 27 laboratories have submitted results in both modes. The results were processed regardless of the method and according to the methods for Bayer (N = 19) and IL analyzers (N = 4). Student's t-test was applied to estimate the result difference between control and arterial mode, with a significance level of $P < 0.05$.

Statistically significant differences were found in results for the partial pressure of carbon dioxide regardless of the method ($P = 0.001$) and according to the method for Bayer analyzers ($P < 0.001$), and in results for pH according to the method for Bayer analyzers ($P = 0.022$).

Considering different algorithms used in different types of blood gas analyzers to calculate pH, blood gases and ionized electrolytes in the commercial control solutions, whose composition differs significantly from human samples, we recommend that commercial control samples are analyzed according to the manufacturer's instructions of blood gas analyzers.

e-mail: sonja.perkov@hdmh.hr

ZR2-3

Kvalitativna analiza mokraće – novi pristup

Sikirica M¹, Juretić D²

¹Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

²Hrvatsko društvo medicinskih biokemičara, Zagreb

Kvalitativna analiza mokraće je pretraga koja se još uvijek najčešće izvodi na klasičan način, što zbog svoje složenosti zahtijeva puno vremena za izvođenje, ali i dobru edukaciju posebno u dijelu morfološke analize elemenata sedimenta mokraće. Novi pristup u kompletnoj analizi mokraće je njena automatizacija kroz primjenu kemijskih analizatora za određivanje urinskih parametara test trakom kao i automatizirana mikroskopija. To omogućava potpunu standardizaciju pretrage u svim dijelovima analitičkog procesa uz značajno smanjenje vremena potrebnog za izvođenje cijelog postupka.

Dobiveni rezultati nacionalnog programa vanjske procjene kvalitete rada (provodi ga Povjerenstvo za vanjsku procjenu kvalitete rada Hrvatskog društva medicinskih biokemičara – HDMB) kod kemijske analize test trakama pokazuju da je u uporabi veliki broj test traka različitih proizvođača. Vizualno očitavanje test traka još uvijek je dosta zastupljeno, naročito u laboratorijima primarne zdravstvene zaštite (68%), dok je u laboratorijima sekundarne zdravstvene zaštite nešto manja (44%). Rezultati se iskazuju najčešće u arbitrarnim jedinicama (1/+; 2/++; 3/+++; 4/++++). Kako je preporuka europske grupe za analizu mokraće da se dobivene vrijednosti u nalazu iskazuju semikvantitativno u SI sustavu, potrebno je da laboratoriji obavezno uvedu instrumentalno očitavanje dobivenih rezultata kako bi objektivizirali nalaz standardiziranim postupkom. U dijelu identifikacije elemenata sedimenta mokraće dobiveni rezultati pokazuju da još uvijek veliki broj medicinsko-biokemijskih laboratorija ne koristi bojanje sedimenta u svjetlosnoj mikroskopiji kao preporučeni postupak dok se identifikacija staničnih elemenata iskazuje isključivo na osnovnoj razini mikroskopske podjele. Kvantifikacija staničnih elemenata se iskazuje različito. Kao i u dijelu kemijske analize test trakom i mikroskopija sedimenta mokraće danas je automatizirana čime je kvantifikacija staničnih elemenata objektivizirana što omogućava njihovo iskazivanje u SI sustavu.

Proširenjem nacionalnog programa vanjske procjene kvalitete rada na poslijeanalitičku fazu oblikovanja nalaza kao konačnog dokumenta analitičkog procesa, želi se standardizirati i taj dio kako bi se postigla međulaboratorijska usporedivost koja omogućava prihvaćanje nalaza bez obzira gdje je učinjen.

e-pošta: mirjana.sikirica@gmail.com

ZR2-3

Qualitative urine analysis – new approach

Sikirica M¹, Juretić D²

¹Institute of Clinical Chemistry, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

²Croatian Society of Medical Biochemists, Zagreb, Croatia

Qualitative urinalysis is a test mostly performed in a classical way what is due to its complexity time consuming and requires well educated staff, especially in morphological analysis of urine sediment elements. A new approach to the urinalysis presents its automatization by implementation of chemical analyzers for urine parameters estimation by test strips as well as automated microscopy. It enables total test standardization in every part of analytical process with significantly less time required for the whole procedure.

Results obtained from the national external quality assessment scheme (conducted by the Committee for External Quality Assessment of Croatian Society of Medical Biochemists, CSMB) from chemical analysis with test strip show that participating laboratories use a large number of test strips from different manufacturers. Visual measuring from test strips is still frequently in use, especially in primary health care laboratories (69%) while in secondary health care laboratories it is less frequent (44%). Results are commonly expressed in arbitrary units (1/+; 2/++; 3/+++; 4/++++). The European group for urinalysis recommends that results should be expressed semiquantitative within the International system of units (SI). Therefore, laboratories need to introduce instrumental measuring of results in order to make a test result more objective by implementation of standard procedure. Obtained results from identification of urine particle show that still a large number of medical biochemistry laboratories do not use sediment staining in light microscopy as the recommended procedure, whereas identification of cellular elements is expressed only on the basic level of microscopy differentiation. Cellular elements quantification is expressed differently. Similar to the chemical analysis of test strip, urine sediment microscopy is today also automated what makes cellular elements quantification more objective and furthermore enables to express the results in SI system.

Expanding the national external quality assurance scheme onto the postanalytical phase of issuing the test results as the final document of analytical process aims towards standardization of that part in order to achieve interlaboratory comparability which enables acceptance of test results regardless of where it has been performed.

e-mail: mirjana.sikirica@gmail.com

ZR2-4

Kontrola kvalitete određivanja hormona i tumorskih biljega – naša iskustva

Đurić K¹, Juretić D²

¹Medicinsko-biokemijski laboratorij, Poliklinika Sunce, Zagreb

²Hrvatsko društvo medicinskih biokemičara, Zagreb

Vanjska procjena kakvoće rada medicinsko biokemijskih laboratorija (MBL) u Hrvatskoj provedena je za hormone (TSH, T3, T4, FT3, FT4) i tumorske biljege (CA 15-3, CA-125, CA-19-9, AFP, CEA, PSA) u 2 ciklusa tijekom 2008. godine a isto je planirano i u 2009. (do sada proveden 1. ciklus). Kontrolni uzorci za vanjsku procjenu bili su komercijalni kontrolni materijali s deklariranim vrijednostima prema analitičkim metodama/analizatorima različitih proizvođača. Kriteriji za prihvaćanje rezultata tumorskih biljega su deklarirane vrijednosti kontrolnog uzorka unutar $\pm 2SD$ i/ili ciljne vrijednosti prema veličini biološke varijacije i u kombinaciji s kliničkim kriterijima. Kriteriji za prihvaćanje rezultata hormona su deklarirane vrijednosti kontrolnog uzorka unutar $\pm 2SD$ i/ili ciljne vrijednosti prema veličini biološke varijacije izražene kao ukupna dozvoljena analitička pogreška.

U 1. ciklusu kontrole u 2009. godini sudjelovalo je 56 MBL u modulu hormoni i 50 MBL u modulu tumorski biljezi. Od ukupnog broja MBL koji su sudjelovali u ciklusu, 19 (34%) ih je bilo iz primarne zdravstvene zaštite (domovi zdravlja i privatni MBL) u modulu hormoni i 15 (30%) u modul tumorski biljezi. Broj laboratorija koji su sudjelovali u 1. ciklusu kontrole u 2009. godini je veći od prosječnog broja MBL koji su sudjelovali u dva kruga kontrole tijekom 2008 (45 MBL u modulu hormoni i 42 u modulu tumorski biljezi).

Paralelno s porastom broja MBL koji sudjeluju u kontroli kvalitete hormona i tumorskih biljega raste i broj različitih analitičkih metoda/analizatora prema proizvođačima. U modulu tumorski biljezi, najviše laboratorija sudjeluje u kontroli određivanja PSA, a u modulu hormoni za TSH. Broj različitih analitičkih metoda/analizatora prema proizvođačima porastao je za PSA s 8 na 10, a za TSH s 11 na 15 uspoređujući 2008. i 2009. godinu. Najviše MBL koji sudjeluju u vanjskoj procjeni kakvoće rada HDMB rabi Roche Elecsys ECLIA imunokemijsku metodu za određivanje TSH, T3, T4, FT3 i FT4 (prosječno 39%) i CA 15-3, CA-125, CA-19-9, AFP, CEA, PSA (prosječno 49%).

Prihvatljivost rezultata za pojedine hormone i tumorske biljege bilo je moguće izračunati za prosječno 80% laboratorija koji su sudjelovali u modulu hormoni i 90% laboratorija u modulu tumorski biljezi. Za ostale MBL nije bilo

ZR2-4

External Quality Assessment of hormone and tumor marker determination – our experience

Đurić K¹, Juretić D²

¹Medical Biochemistry Laboratory, Sunce Polyclinic, Zagreb, Croatia

²Croatian Society of Medical Biochemists, Zagreb, Croatia

External Quality Assessment (EQA) in Medical Biochemistry Laboratories (MBL) in Croatia was organized two times per year for hormones (TSH, T3, T4, FT3, FT4) and tumor markers (CA15-3, CA-125, CA19-9, AFP, CEA, PSA) during 2008, and the same is planned for 2009 (only one cycle finished till now). Control samples used for EQA in surveys for hormones and tumor markers were commercial control materials with defined target values according to different analytical methods/instruments. Analytical goal setting for tumor marker was declared value of control sample $\pm 2SD$ and/or target value according to the combination of biological variation and clinical criteria. Analytical goal setting for hormone was declared value of control sample $\pm 2SD$ and/or target value according to the biological variation (total allowed analytical error).

A total of 56 laboratories participated for hormones and 50 laboratories for tumor markers during first survey in 2009. Among these, 19 (34%) in hormone module and 15 (30%) in tumor marker module were from primary health care facilities, respectively. Total number of participating laboratories in both modules was greater in 2009 survey when compared to two surveys in 2008 (on average 45 MBL participated for hormones and 42 for tumor markers).

Unfortunately, parallel with increase in total number of participating laboratories was increase in number of analytical methods/instruments different according to manufacturer. In the survey for tumor markers, most laboratories participated with PSA determination, and in the survey for hormones with TSH determination. The number of different analytical methods/instruments used for analyte determination increased from 8 to 10 for PSA and from 11 to 15 for TSH, when comparing surveys in 2008 to first one in 2009. Most laboratories participating in EQA surveys in Croatia during 2008 and 2009 used Roche Elecsys ECLIA methods for TSH, T3, T4, FT3, FT4 determination (39% on average) and CA15-3, CA-125, CA19-9, AFP, CEA, PSA (49% on average).

The application of defined quality specifications was possible only for 80% of laboratories in hormone survey and 90% in tumor marker survey, respectively. Calculations for other laboratories were not possible due to statistical-

moguće vršiti procjenu prema metodi/instrumentu jer su bili jedini rezultati u pojedinom modulu.

Procjena rezultata određivanja hormona pokazala je neprihvatljivu varijabilnost rezultata bez obzira na metodu za TSH (KV 13,9%), T3 (KV 12,9%), FT4 (KV 27,2%), FT3 (KV 27,4%).

Ukupna varijabilnost (bez obzira na metodu) određivanja tumorskih biljega u tri ciklusa kontrole bila je prosječno 8,1% za PSA, 11,2% za CA15-3, 11,3% za AFP, 11,5% za CEA, 13,6% za CA-125 i 26,9% za CA19-9.

Zbog heterogenosti analizatora i imunokemijskih metoda koje laboratoriji koriste pri određivanju hormona i tumorskih biljega, te statistički nedovoljnog broja zaprimljenih rezultata za velik broj metoda/analizatora, rezultati vanjske procjene hormona i tumorskih biljega tijekom 2008. godine nisu uzeti u obzir pri procjeni ukupne prihvatljivosti rezultata za MBL.

e-pošta: koraljka.duric@sunce.hr

ly inadequate number of results for some analytical methods/instruments (one or two results in every survey).

EQA results for hormones and tumor markers in 2008 and first half of 2009 showed unacceptable high overall variability (all analytical methods/instrument), expressed as coefficient of variation (KV), for TSH (13.9%), T3 (12.9%), FT4 (27.2%) and FT3 (27.4%). The average variability in three surveys for tumor markers was 8.1% for PSA, 11.2% for CA15-3, 11.3% for AFP, 11.5% for CEA, 13.6% for CA-125 and 26.9% for CA19-9.

Due to significant heterogeneity of immunochemical analytical methods and instruments participating in EQA surveys for hormones and tumor markers (and statistically inadequate number of results for most of them as a consequence), the results of these surveys were not taken into account for overall scoring of laboratory achievement of analytical quality goals.

e-mail: koraljka.duric@sunce.hr

ZR2-5

Vanjska procjena kvalitete određivanja hemoglobina A1c (2005.-2009.)

Vučić Lovrenčić M¹, Božičević S¹, Juretić D²

¹Sveučilišna klinika za dijabetes, endokrinologiju i bolesti metabolizma
Vuk Vrhovac, Zagreb

²Hrvatsko društvo medicinskih biokemičara, Zagreb

Vanjska kontrola kvalitete određivanja hemoglobina A1c u Hrvatskoj počela se provoditi 2005.g. S obzirom na poznate kontroverze vezane uz nedovršeni globalni projekt harmonizacije određivanja hemoglobina A1c, cilj ovog modula programa VKKR Hrvatskog društva medicinskih biokemičara bio je kroz međulaboratorijske usporedbe analitičke kvalitete postići što je moguće viši stupanj harmonizacije rezultata.

Kao kontrolni materijal odabrani su komercijalni liofilizati eritrocita s deklariranim ciljnim vrijednostima za veliki broj metoda/reagensa prema IFCC i NGSP referentnim sustavima.

U prvom ciklusu provedenom koncem 2005. g. sudjelovalo je 28 laboratorija. U 2006. godini provedena su tri ciklusa, u 2007. i 2008.g. dva ciklusa, i u 2009. (dosad) jedan ciklus vanjske kontrole kvalitete.

Prosječan broj sudionika/ciklusu je u kontinuiranom porastu (29 u 2006., 34 u 2007., 36 u 2008. i 44 u 2009. g.).

Imunoturbidimetrijske metode su najzastupljenije (96%), dok je udio kromatografije na kolonama gotovo zanemariv (4%).

ZR2-5

External Quality Assessment for hemoglobin A1c (2005-2009)

Vučić Lovrenčić M¹, Božičević S¹, Juretić D²

¹Vuk Vrhovac University Clinic for Diabetes, Endocrinology and Metabolic Diseases, Zagreb, Croatia

²Croatian Society of Medical Biochemists, Zagreb, Croatia

External quality assessment (EQA) for hemoglobin A1c determination was implemented in Croatia in 2005.

Regarding well-known controversies within an unfinished global hemoglobin A1c harmonization project, we aimed this EQA module within the Croatian Society of Medical Biochemists EQAS as a tool to obtain as high degree of result harmonization as possible, by using inter-laboratory comparisons of analytical quality.

Commercially available lyophilizates with declared target values according to both IFCC and NGSP reference systems for a large number of methods/reagents were selected as control materials.

28 laboratories participated in the first EQA-cycle at the end of 2005. 3, 2, 2 and 1 cycle(s) were conducted in 2006, 2007, 2008 and 2009 (so far), respectively.

Average number of participants/cycle showed a continuous increase (29, 34, 36 and 44 in 2006, 2007, 2008 and 2009, respectively).

Immunoturbidimetric methods are the most common (96%), whereas an almost negligible proportion of column-chromatography (4%) was reported.

Kvaliteta određivanja, procijenjena prema prema kriterijima ERL (engl. *European Reference Laboratory for Glycohemoglobin*) programa također pokazuje kontinuirano unapređenje: Udio laboratorija čiji rezultati imaju loša/ili neprihvatljiva odstupanja od ciljnih vrijednosti, s početnih 25% smanjivao se iz godine u godinu: 22% (2006.), 15% (2007.), 11% 2008.) do 7% u 1. ciklusu 2009.g. Rezultati potvrđuju opravdanost pokretanja vanjske kontrole kvalitete za hemoglobin A1c i podupiru daljnje aktivnosti na unapređenju kvalitete i kliničke dostupnosti i iskoristivosti hemoglobina A1c kao ključnog laboratorijskog parametra za procjenu kontrole glikemije u bolesnika sa šećernom bolešću.

e-pošta: vucic@idb.hr

ZR2-6

Osvrt na ocjenu analitičkih zahtjeva u vanjskoj procjeni kvalitete HDMB-a

Flegar-Meštrić Z¹, Juretić D²

¹Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

²Hrvatsko društvo medicinskih biokemičara, Zagreb

Organizator programa međulaboratorijskih usporedbi odgovoran je za oblikovanje sheme programa, pomoć laboratorijima u analizi neprihvatljivih rezultata, izvještavanje o dobivenim rezultatima koje mora uključiti: tumačenje ciljnih vrijednosti, način evaluacije rezultata, grafički prikaz dobivenih rezultata, te kontinuirano praćenje rezultata svakog pojedinog laboratorija učesnika. Danas se organizatori vanjske kontrole kvalitete susreću s brojnim novim izazovima vezano uz nove nacionalne zakonske regulacije i zahtjeve za analitičkom kvalitetom vezano uz pokretanje globalne harmonizacije u područje kliničke kemije, postupke akreditacije i uvođenje europske direktive za in vitro dijagnostiku „European Directive 98/79/EC“, u kojoj su i zahtjevi za iskazivanje sljedivosti kalibratora i kontrolnih materijala kroz dostupne referentne mjerne postupke i /ili referentne materijale višeg reda.

Prema novom prihvaćenom standardu za organizatore međulaboratorijskih usporedbi ISO/IEC 17043 – Conformity Assessment-General requirements for PT, kada god je to moguće organizator mora osigurati kontrolne materijale s utvrđenim ciljnim vrijednostima (engl. *assigned value*) za koje je poznata sljedivost do referentnih materijala višeg reda. Samo u slučaju nestandardiziranih metoda, kao što je to u velikom broju koagulacijskih pretraga, kada takovi kontrolni materijali nisu dostupni, kao ciljne vri-

A continuous improvement in quality has been observed by using criteria defined in the ERL (European Reference Laboratory for Glycohemoglobin) Programme. A proportion of the laboratories reporting results with bad/unacceptable deviations from target values decreased from 25% at the beginning to 22%, 15%, 11% and 7% in the 2006, 2007, 2008 and first cycle in 2009, respectively.

These results confirm the validity of implementation of EQA for hemoglobin A1c and support further activities aimed to improve quality, as well as clinical availability and utilization of hemoglobin A1c as a key laboratory parameter for the glycemic control evaluation in diabetic patients.

e-mail: vucic@idb.hr

ZR2-6

Review on quality requirements in Croatian EQA schemes

Flegar-Meštrić Z¹, Juretić D²

¹Institute of Clinical Chemistry, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

²Croatian Society of Medical Biochemists, Zagreb, Croatia

Organizer of interlaboratory comparison program is responsible for design of the scheme, for help provided to laboratories in analysis of unacceptable results, for reporting about obtained results that must include: target value interpretation, result evaluation method, plot of obtained results and continuous monitoring of result from each individual participating laboratory. Nowadays, the EQA organizers encounter numerous challenges related to new national law regulations and analytical quality requirements regarding global harmonization of clinical chemistry, accreditation procedures and introducing the European directive for in vitro diagnosis „European Directive 98/79/EC“. This directive also includes requirements for expressing traceability of calibrator and control material by available reference measuring procedures and/or reference materials of higher order.

According to the new accepted standard for organizers of interlaboratory comparisons ISO/IEC 17043 – Conformity Assessment-General requirements for PT, the organizer needs, whenever possible, to assure control materials with known target values (assigned values) and known traceability to the higher order reference materials. Only in case of non-standard methods, like in many coagulation tests such control materials are not available, so in that case we can take mean group results as target values ac-

jednosti mogu se koristiti srednje vrijednosti grupe prema primijenjenim analitičkim metodama ili analitičkim sustavima (engl. *consensus value*).

U programu nacionalne procjene kvalitete rada medicinsko-biokemijskih laboratorija u Hrvatskoj, kao ciljne vrijednosti rezultata laboratorijskih pretraga definirane su srednje vrijednosti grupe $\pm 2SD$, prema različitim metodama (engl. *consensus value*). Cilj Povjerenstva za vanjsku procjenu kvalitete Hrvatskog društva medicinskih biokemičara (HDMB) je u što većoj mjeri uskladiti način procjene dobivenih rezultata s međunarodno prihvaćenim kriterijima, što znači omogućiti primjenu i takovih kontrolnih uzoraka za koje će biti poznata sljedivost prema referentnim materijalima višeg reda, te iskazana ciljna vrijednost s pripadnom mjernom nesigurnošću.

Za ocjenu prihvatljivosti rezultata laboratorijskih pretraga laboratorija učesnika koristit će se, kao i do sada, međunarodno prihvaćen hijerarhijski pristup analitičkim ciljevima kvalitete koji uz mjeriteljske principe uključuje biološku varijaciju, dijagnostičke potrebe i kliničku korisnost.

U opisanom sustavu zadaća medicinsko-biokemijskih laboratorija je osiguravati rezultate laboratorijskih mjerenja koji su pouzdani i usporedivi na međunarodnoj razini, zašto je neophodno provoditi stalne edukacijske aktivnosti i podizati razinu mjeriteljske svijesti u čemu je vrlo značajan doprinos programa međulaboratorijskih usporedbi.

e-pošta: zlata.mestric@zg.t-com.hr

ZR2-7

Poslijeanalitička faza kao modul u nacionalnom programu vanjske procjene kvalitete rada medicinsko-biokemijskih laboratorija

Juretić D

Hrvatsko društvo medicinskih biokemičara, Zagreb

Primjenom odgovarajućih programa za obradu podataka vanjske procjene rada, koji osim rezultata moraju sadržavati također podatke o analitičkim metodama i analitičkim sustavima koje laboratoriji koriste, omogućuje se prepoznavanje uzroka međulaboratorijske varijabilnosti i dobiva uvid u uvjete rada svakog laboratorija. Iz toga proizlazi i važnost nacionalnog programa vanjske kontrole, koji se neprestano nadopunjava i osuvremenjuje u skladu s internacionalnim preporukama i tako služi kao osnova za uvođenje novih tehnologija i preporuka u svim fazama rada medicinsko-biokemijskog laboratorija te njihovu stalnu provjeru.

cording to applied analytical methods or systems (consensus values).

In national external quality assessment scheme for medical biochemical laboratories in Croatia target values of laboratory test results are defined as mean target values of the group $\pm 2SD$ according to different methods (consensus value). The goal of the Committee for External Quality Assessment of Croatian Society of Medical Biochemists (CSMB) is to harmonize as much as possible the way of result assessment with internationally accepted criteria, what means, to enable application of such control samples with known traceability to higher order reference materials and expressed target value with appropriate measuring uncertainty.

For acceptability evaluation of participating laboratories' test results we shall continue to implement internationally accepted hierarchical approach to analytical quality goals which include metrological principles, biological variation, diagnostic needs and clinical usefulness.

The task of medical biochemical laboratories in described system is to provide test results that are reliable and comparable on the international level. Therefore, it is essential to conduct continuous educational activities and put the metrological consciousness on a higher level, what the program of interlaboratory comparisons can contribute to.

e-mail: zlata.mestric@zg.t-com.hr

ZR2-7

Postanalytical phase as a modul in the national External Quality Assessment scheme for medical-biochemistry laboratories

Juretić D

Croatian Society of Medical Biochemists, Zagreb, Croatia

Sources of interlaboratory variability could be recognized by application of appropriate programs for the evaluation of external quality assessment (EQA) data which include results of medical biochemistry laboratories as well as details on analytical methods and analytical systems used. Therefore, it is important that EQA schemes exist on the national level and that their organization could be improved continuously according to the international recommendations. Furthermore, EQA programs could provide the basis for the introduction and continuous monitoring of modern technology and new recommendations in all phases of the laboratory work.

Značajan doprinos povećanju stupnja međulaboratorijske usporedivosti učinjen je kroz projekt „Harmonizacija laboratorijskih rezultata“ u suradnji Hrvatske komore medicinskih biokemičara, Zavoda za kliničku kemiju Kliničke bolnice Merkur kao Referentnog centra Ministarstva zdravstva za izradu referentnih intervala iz područja opće medicinske biokemije i Hrvatskog društva medicinskih biokemičara kao organizatora nacionalnog programa vanjske procjene kvalitete. Cilj projekta je bio povećati analitičku i kliničku usporedivost rezultata između laboratorija primarne, sekundarne i tercijarne zdravstvene zaštite u Hrvatskoj. Na osnovu podataka vanjske procjene kvalitete od 1998. do 2003. ustanovljeno je da se moraju revidirati neke od preporučenih metoda kako bi se omogućila klinička usporedivost rezultata kroz primjenu jedinstvenih referentnih intervala.

Realizacijom navedenih programa harmonizacije laboratorijskih metoda i pripadnih referentnih intervala stekli su se preduvjeti za proširenje nacionalnog programa vanjske procjene kvalitete rada na izvananalitičku fazu.

Proširenjem nacionalnog programa vanjske procjene kvalitete rada na poslijeanalitičku fazu oblikovanja nalaza kao konačnog dokumenta analitičkog procesa u 212 medicinsko-biokemijskih laboratorija u Hrvatskoj, a temeljem preporuka u dokumentu „Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće, specijalne i visokodiferentne medicinske biokemije. Priručnik HKMB, Medicinska naklada-Zagreb, 2007. dobit će se podaci potrebni za standardizaciju i tog dijela rada medicinsko-biokemijskog laboratorija.

Harmonizacija u dijelu izvještavanja o rezultatima laboratorijskih analiza – poslijeanalitička faza, kao konačnog dokumenta analitičkog procesa temelji se na preporukama IFCC-a i IUPAC-a (A Proposal for an IUPAC-IFCC Recommendation. Syntax and Semantic Rules for Quantities and Units in Clinical Laboratory Sciences 1993: stage 1, draft 4.) te zahtjevima akreditacijske norme za medicinske laboratorije HRN EN ISO 15189:2006.

Kako usporedivost rezultata laboratorijskih analiza ovisi o standardizaciji svih faza laboratorijskog procesa, programi vanjske procjene kvalitete rada medicinsko-biokemijskih laboratorija u dijelu izvananalitičke faze trebaju obuhvaćati i predanalitičku fazu koja je izvor najvećeg broja laboratorijskih pogrešaka i time dati cjelovit uvid u aktualno stanje struke s ciljem stalnog poticanja poboljšanja stručnog rada i podizanju kvalitete rada medicinsko-biokemijskih laboratorija kako na nacionalnoj tako i na međunarodnoj razini.

e-pošta: dubravka.juretic09@gmail.com

In Croatia, a great impact on the increase of interlaboratory comparison has been done by the project on harmonization of laboratory results organized in collaboration of the Croatian Chamber of Medical Biochemists, Institute of Clinical Chemistry Clinical Hospital Merkur as a reference center of the Ministry of Health for the determination of the reference intervals in the field of general medical biochemistry and the Croatian Society of Medical Biochemists as the organizer of the EQA schemes for medical biochemistry laboratories. The goal of the project was to improve analytical and clinical comparability of the results between the medical biochemistry laboratories on primary, secondary and tertiary levels. According to the evaluation of the EQA results in the period from 1998 to 2003, it was obvious that some of the previously recommended analytical methods have to be revised to enable clinical comparison of the laboratory results through application of common reference intervals.

Due to the implementation of the mentioned harmonization program in the field of laboratory methods and common reference intervals, prerequisites are achieved for the introduction of extra-analytical phases in the national EQA program.

Goal of the post-analytical phase as a module in the national EQA scheme is to analyze the laboratory reports as a final documents prepared by 212 medical biochemistry laboratories in Croatia according to the recommendations shortly presented in the document on harmonization of laboratory reports in the field of general, special and very sophisticated medical biochemistry analysis, issued by the Croatian Chamber of Medical Biochemists 2007.

Harmonization in the field of laboratory results reporting – post-analytical phase as a final document of the analytical process is based on IFCC and IUPAC recommendations (A Proposal for an IUPAC-IFCC Recommendation. Syntax and Semantic Rules for Quantities and Units in Clinical Laboratory Sciences 1993: stage 1, draft 4.) and on the requirements for the accreditation of medical laboratories (HRN EN ISO 15189:2006.).

Due to the fact that comparability of the laboratory analyses depends on the standardization of all phases of the laboratory work, EQA programs for medical biochemistry laboratories have to include also pre-analytical phase as a source of the significant number of laboratory errors. Then it will be possible to gain the complete insight in the state of the art of the medical biochemistry profession with the goal to permanently improve the quality of medical biochemistry laboratories on the national as well as international level.

e-mail: dubravka.juretic09@gmail.com

ZR3 – Edukacija**ZR3-1****Diplomsko i poslijediplomsko obrazovanje magistara medicinske biokemije u Hrvatskoj: usporedbe s Europom**

Žanić Grubišić T, Čepelak I

Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Programi diplomskog i poslijediplomskog Studija medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu odražavaju multidisciplinarni karakter struke koji je nužan za primjenu suvremenih znanstvenih spoznaja u kliničkom okruženju. Usklađen je s preporukama stručnih foruma Europske unije koji reguliraju djelatnost struke, a predviđa petogodišnji ciklus diplomske edukacije, nakon čega slijedi 4-5 godišnja specijalizacija u sustavu zdravstva.

Studij je organiziran kao integrirani preddiplomski i diplomski studij u trajanju od 10 semestara (5 godina, 300 ECTS bodova). Po završetku studija stječe se akademski naziv magistra medicinske biokemije. Ciljevi obrazovnog procesa u okviru diplomskog i poslijediplomskog specijalističkog studija postižu se na 3 razine:

1) stjecanje znanja i razumijevanja temeljnih prirodnih znanosti (matematika, kemija, fizika, statistika, biokemija, biologija) i (ii) temeljnih biomedicinskih znanosti (anatomija, fiziologija, patofiziologija, histologija i citologija, imunologija, genetika i molekularna biologija, mikrobiologija, parazitologija, farmakologija;

2) stjecanje znanja, razumijevanja, mogućnosti primjene te analize, sinteze i evaluacije za stručna medicinsko biokemijska znanja (klinička biokemija, biokemijska i molekularna dijagnostika u hematologiji i koagulaciji, kliničkoj imunologiji, transfuziologiji, klinička citologija, mikrobiologija, analitička toksikologija, laboratorijska dijagnostika hitnih stanja, dijagnostika uz bolesničku postelju, racionalna laboratorijska dijagnostika) i

3) stjecanje generičkih vještina i odgovarajućih znanja iz organizacijskih i komunikacijskih disciplina (organizacija i upravljanje medicinsko biokemijskim laboratorijem, automatizacija i informatizacija laboratorijskog sustava).

U ukupnom petogodišnjem studiju ima 28 % temeljnih, 12% biomedicinskih, 45% stručnih i 15% izbornih predmeta. Slična koncepcija udjela pojedinih općih i stručnih predmeta može se naći i u specijalističkim programima drugih europskih zemalja, u kojima se za rad u kliničkim laboratorijima usmjeravaju stručnjaci koji su temeljno obrazovanje stekli u području prirodnih znanosti ili studiju farmacije. Oni čine dvije trećine od ukupno 30.000 regi-

ZR3 – Education**ZR3-1****Graduate and postgraduate education of medical biochemists in Croatia: comparison with European concepts**

Žanić Grubišić T, Čepelak I

Department of Medical Biochemistry and Haematology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Academic curricula for graduate and postgraduate studies in Medical Biochemistry at the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb are organised to provide knowledge for multidisciplinary character of the profession what is needed for successful application of scientific results in the clinical practice. The program is harmonised with recommendations of European Communities Confederation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Academic education is lasting 5 years that are followed by 4-5 years of specialisation and training in the health care system.

Study program for Masters Degree in Medical Biochemistry is composed of 10 semesters (5 years and 300 ECTS credits). The main goals of graduate and postgraduate education are performed on 3 levels:

1) gaining knowledge and comprehension of (i) basic natural sciences (mathematics, chemistry, physics, statistics, biochemistry, biology) and (ii) basic biomedical sciences (anatomy, physiology, pathophysiology, histology, cytology, immunology, genetics, molecular biology, microbiology, parasitology, pharmacology)

2) gaining knowledge, comprehension and capacities to apply, analyse and evaluate professional medical biochemical expertise in: clinical biochemistry, biochemical and molecular diagnostics in haematology, clinical immunology, blood banking, clinical cytology, microbiology, analytical toxicology, evidence based laboratory medicine, point of care, and

3) developing generic skills and related expertise in communication, clinical laboratory management and organisation, automation and informatisation of laboratory practise.

The syllabus is composed of: 28% basic sciences, 12% biomedical sciences, 45% professional subjects and 15% elective courses calculated according to ECTS credits. Similar conception of educational program is applied in other countries in European Union that have science and pharmacy educated professionals continuing further specialist education in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Science or pharmacy educated professionals comprise about two thirds of the total 30.000 practising professionals in EU, and one third is medically educated.

striranih specijalista kliničke kemije i laboratorijske medicine u EU, dok preostalu trećinu čine specijalisti educirani u liječničkom zvanju.

Program predviđa maksimalno povezivanje osnovnih i stručnih predmeta, pa se stručna praksa provodi već od prve godine u realnom radnom okruženju, u intenzivnoj teorijskoj i praktičnoj suradnji s kliničkim bazama Fakulteta. Diplomirani stručnjak stječe cjelovito znanje i kompetencije iz medicinske biokemije te, organizacije, primjene i uvođenja suvremene tehnologije u laboratorijsku praksu, i posebice kompetencija potrebnih za evaluaciju i interpretaciju laboratorijskih nalaza, vezanu uz biokemijske analitičke postupke. To ga čini kompetentnim članom stručnog medicinskog tima koji zbrinjava bolesnika.

Doktorski studij Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, namijenjen medicinskim biokemičarima i drugim stručnjacima iz područja Biomedicine i zdravstva te Prirodnih znanosti ima za cilj obrazovati pristupnika za samostalan istraživački rad u području znanosti, obrazovanja i gospodarstva. U tu svrhu doktorski studij pruža temeljito istraživačko iskustvo u specifičnim područjima medicinske biokemije, i biomedicine općenito. Izvodi se u vremenu od 3-4 godine za redovite i 6-8 godina za izvanredne studente. Studij uključuje manjim djelom organiziranu nastavu, a većim djelom aktivno bavljenje znanstveno-istraživačkim radom. Završava polaganjem ispita, pozitivnom procjenom znanstvene aktivnosti te pozitivnom ocjenom i obranom doktorskog rada.

e-pošta: tihana_zanic@yahoo.co.uk

The program is organised as to integrate basic knowledge and professional skills. Clinical training is starting already at the first academic year in intensive collaboration with clinical hospitals. Successful candidate that has graduated this program is equipped with general knowledge in medical biochemistry and competences needed to organise, apply and introduce new technologies in laboratory practice and to evaluate laboratory findings, in particular quality control and expert selection of analytical procedures, making her/him competent member of medical team that is providing health care for the patients.

Postgraduate doctoral studies at the Faculty of Pharmacy and Biochemistry are providing scientific and research education for medical biochemists and other academics trained in biomedicine and health care, or in natural sciences. The main goal is to provide education for competent scientific research in scientific institutes, university clinics and pharmaceutical industry. For that purpose doctoral studies are offering environment for scientific research in specific fields of medical biochemistry and general biomedicine.

Doctoral studies are organised in 3-4 years for regular, and 6-8 years for students that are not employed at the universities or institutes. Postgraduate program is mainly based on research connected with the doctoral thesis and to lesser extent on organised courses. The doctoral degree is obtained after successful evaluation of research activities and defending of doctoral thesis.

e-mail: tihana_zanic@yahoo.co.uk

ZR3-2

Edukacija laboratorijskih tehničara i laboratorijskih specijalista u Češkoj. Primjer s Farmaceutskog fakulteta Karlovog sveučilišta

Dršata J

Farmaceutski fakultet, Karlovo sveučilište, Hradec Králové, Češka

Farmaceutski fakultet Karlovog sveučilišta nudi pored petogodišnjeg diplomskog studija također program bioanalitike u zdravstvenoj skrbi. Taj je program sastavljen prema Češkom zakonu br. 96/2004, koji definira uvjete školovanja laboratorijskih tehničara i specijalista laboratorijskih metoda. Sukladno s Bolonjskim procesom, program ujedinjuje dva koraka – trogodišnji preddiplomski studij i nastavno na njega dvogodišnji diplomski studij.

ZR3-2

Education of laboratory technicians and specialists in laboratory methods in the Czech Republic. Example of the Charles University Faculty of Pharmacy

Dršata J

Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

Charles University Faculty of Pharmacy offers, besides the five-year Pharmacy Master study course, also the program of Healthcare Bioanalytics. The program is drawn up according to the Czech law No. 96/2004, which defines conditions for education of Laboratory technicians and Specialists in laboratory methods. In accord with recommendation of Bologna declaration, the program

Prvostupnik, student koji završi preddiplomski studij, je sveučilišno školovan stručnjak zdravstvene skrbi osposobljen za rad u svim tipovima kliničkih i zdravstvenih laboratorija na mjestu laboratorijskog stručnjaka. Student koji je završio diplomski studij školovan je za nezavisni rad i upravljanje aktivnostima u svim tipovima kliničkih i zdravstvenih laboratorija na mjestu specijalista laboratorijskih metoda. Diplomski studij u Hradec Králové predstavlja jedini potpuni program akreditiran u Republici Češkoj za školovanje laboratorijskih specijalista zdravstvene zaštite ne-medicinskog usmjerenja. Magistar je školovan da bude savjetnik liječnicima i suradnicima u laboratoriju na području laboratorijskih metoda, kliničkog značaja laboratorijskih nalaza i njihovog tumačenja. Magistar diplomskog studija može nastaviti svoje školovanje na doktorском studiju.

Raspravljat će se o pregledu trenutnog programa studija kao i usporedbi tog tima studija s prethodnim srednjoškolskim obrazovanjem koje je pripremalo za zanimanje laboratorijskog tehničara.

e-pošta: Jaroslav.Drsata@faf.cuni.cz

comprises of two steps – a three-year Bachelor studies, and a linking-up two-year Master program.

The graduate from Bachelor studies is a university-trained healthcare professional capable of working in all types of clinical and sanitary service laboratories at position of Laboratory technician. The graduate from the Master program is trained for independent work and management activities in all types of clinical laboratories and sanitary service at position of Specialist in laboratory methods. The Master studies in Hradec Králové represent the only complete program for education of non-medical healthcare laboratory specialists accredited in the Czech Republic. The graduate is prepared to be advisor to physicians and to laboratory co-workers in laboratory methods, in the clinical relevance of laboratory results and in their interpretation. The graduate from the Master studies may continue her/his education in doctoral studies (PhD).

A survey of the current curriculum of the program as well as comparison of this type of studies to former secondary school education preparing Laboratory technicians will be discussed.

e-mail: Jaroslav.Drsata@faf.cuni.cz

ZR3-3

Studij laboratorijske (bio)medicine na Sveučilištu u Ljubljani

Marc J

Katedra za kliničku biokemiju, Farmaceutski fakultet, Sveučilište u Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Laboratorijska biomedicina (LBM) je studijski program na Farmaceutskom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani. Sveučilište u Ljubljani je jedno od tri sveučilišta u Sloveniji koje je osnovano 1919. na temelju stoljetne tradicije školovanja i obrazovanja te je pedesetak godina bilo jedino slovensko sveučilište. Svojom veličinom može se ubrojiti u red velikih sveučilišta s više od 63.000 studenata diplomskog i poslijediplomskog studija, 4.000 profesora visokog obrazovanja na 22 fakulteta, 3 umjetničke akademije i jednog sveučilišnog koledža. Sveučilište je poznato po kvalitetnim studijskim programima te će se gotovo svi studijski programi sljedeće akademske godine (2009/2010) ponuditi u skladu s bolonjskim procesom. Farmaceutski fakultet je jedan od fakulteta koji nudi četiri studijska programa. Dva su diplomski sveučilišni programi a dva su poslijediplomski studijski programi. LBM je studijski program

ZR3-3

Education in laboratory (bio)medicine at University of Ljubljana

Marc J

Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

The laboratory biomedicine (LBM) study program is carried out at Faculty of Pharmacy at the University of Ljubljana. University of Ljubljana is one of three universities in Slovenia which was founded in 1919 on the basis of centuries of educational tradition, remaining the only Slovenian university for half a century. It ranks as a very large university, with more than 63,000 graduate and postgraduate students, 4000 higher education teachers in the 22 faculties, 3 arts academies and one university college. The university is renowned for its quality study programs and almost all of the study programs in the 2009/2010 academic years will be offered in accordance with the Bologna Declaration. Faculty of Pharmacy as one of faculties carries out four study programs. Two of them are undergraduate university programs and two are postgraduate master degree studies. The laboratory biomedicine (LBM)

na Farmaceutskom fakultetu orijentiran na različita polja laboratorijske medicine kao što su medicinska (bio)kemija, hematologija, transfuziologija, mikrobiologija, histologija, patologija itd. Na početku, 1995.g. je LBM postojao kao dvogodišnji srednjoškolski program, međutim 5 godina kasnije je produžen na trogodišnji sveučilišni studijski program. Nakon 2008. je obnovljen prema Bolonjskom procesu u 1. korak sveučilišnog studijskog programa, koji se nadalje može nastaviti kao dvogodišnji doktorski studij (2. korak Bolonjskog procesa). Sveučilišni studij LBM daje naglasak na analitičku pozadinu, dok se magistarski stupanj fokusira na tumačenje rada laboratorijske medicine. Stoga bi se mogla otvoriti specijalizacija za medicinsku biokemiju za specijalista medicinske biokemije. Dodatak studijskom programu LBM na Fakultetu za farmaciju čine klinička kemija (jedan od osnovnih predmeta), klinička biokemija, imunologija i ostali. Postoje još dva studija koja u svojem programu studija nude predmet klinička kemija. To su studij biotehnologije na Biotehničkim fakultetu i studij biokemije na Fakultetu za kemiju i kemijsku tehnologiju, oba su dio Sveučilišta u Ljubljani. Na poslijediplomskom doktorskom studiju biomedicine na Sveučilištu u Ljubljani postoji tečaj kliničke biokemije i laboratorijske biomedicine čime se zaokružuje školovanje na području laboratorijske medicine na Sveučilištu u Ljubljani.

e-pošta: janja.marc@ffa.uni-lj.si

study program at Faculty of Pharmacy is oriented to different fields of laboratory medicine like clinical (bio)chemistry, hematology, transfusiology, microbiology, histology and pathology, etc. At the beginning, in 1995, it was a two-year high school program of LBM, however five years latter it was prolonged to three-year university study program. Since 2008 it changed (according to Bologna declaration renovated) to the 1. Step university study program, which could be continued by two-year master degree (2.step of Bologna study). The university study of LBM emphasis the analytical backgrounds, but master degree is focused on interpretation of the laboratory medicine profession. Therefore it could be possible to open the specialization of medical biochemistry to masters of LBM. In addition to study program of LBM at the faculty of pharmacy the students have Clinical chemistry (one of basic subjects), Clinical biochemistry, Immunology, etc. There is two of other studies offered the clinical chemistry subject in their study programs. These are study of Biotechnology at Biotechnical Faculty and study of Biochemistry at Faculty of chemistry and chemical technology, both at University of Ljubljana. Finally at the postgraduate PhD study Biomedicine at University of Ljubljana, there is a course of Clinical biochemistry and laboratory biomedicine what round up the education in laboratory medicine at the University of Ljubljana.

e-mail: janja.marc@ffa.uni-lj.si

ZR3-4

Klinička biokemija: diplomski i poslijediplomski programi edukacije na Sveučilištu u Pečuhu, Mađarska

Koszegi T

Zavod za laboratorijsku medicinu, Sveučilište u Pečuhu, Pečuh, Mađarska

Donošenje odluka u suvremenoj medicini sve više počiva na primjeni točnih laboratorijskih parametara dobivenih iz uzoraka od bolesnika. Kako bi se povećao dijagnostički potencijal laboratorijskih pretraga, velika je potreba za poboljšanjem znanja osoblja koje izvršava, procjenjuje i vrednuje laboratorijske rezultate. Pored školovanja stručnjaka u laboratorijskoj medicini, jednaku važnost treba dati podučavanju kliničke biokemije na diplomskom i poslijediplomskom studiju za studente medicine, farmacije i na doktorskom medicinskom studiju.

U Mađarskoj se na poslijediplomskom studiju specijalizacija iz kliničke laboratorijske medicine tradicionalno te-

ZR3-4

Clinical biochemistry: undergraduate and postgraduate educational programs at University of Pecs, Hungary

Koszegi T

Institute of Laboratory Medicine, University of Pecs, Pecs, Hungary

Decision making in modern medicine relies more and more on the use of exact laboratory parameters obtained from patients' samples. In order to increase the diagnostic potential of laboratory tests there is an ultimate need for improving the knowledge of the staff performing, evaluating and validating the lab results. Besides training the experts in laboratory medicine it is of the same importance to teach Clinical Biochemistry at the undergraduate and postgraduate level for students of medicine, of pharmacy and medical doctors.

melji na medicinskom školovanju. Međutim, tijekom zadnjih desetak godina sve više se stručnjaka iz drugih područja pridružio osoblju kliničkih laboratorija (npr. biolozi, farmaceuti, kemičari). U sklopu diplomskog studija na Fakultetu opće medicine Sveučilišta u Pečuhu studenti medicine slušaju kliničku biokemiju jedan semestar na četvrtoj godini (14 sati predavanja i 14 sati praktične nastave) na mađarskom, engleskom i njemačkom jeziku. Studenti farmacije slušaju kliničku biokemiju na 9. semestru na mađarskom jeziku (24 sati predavanja). Na našem Fakultetu zdravstvenih znanosti postoji četverogodišnji diplomski studij za laboratorijskog djelatnika nakon čega se dobiva diploma koja je ekvivalent tituli magistra znanosti. Ta se akademskia titula može dobiti i putem školovanja na daljinu.

Za doktora medicina potrebno je završiti pet godina poslijediplomskog školovanja kako bi se dobio specijalistički stupanj iz kliničke laboratorijske medicine nakon što se položi specijalistički ispit. Prije nekoliko godina stručnjaci s ne-medicinskim sveučilišnim školovanjem također su imali mogućnost nakon školovanja i položenog specijalističkog ispita dobiti specijalistički stupanj iz kliničke kemije. Djelatnici medicinskog laboratorija imaju ključnu ulogu u izvršavanju i nadgledanju rutine rada u laboratoriju te poboljšanju njegove kvalitete rada. U bližoj budućnosti (kao dio Bolonjskog procesa) voljeli bi organizirati studij za medicinsko laboratorijskog istraživača s mogućnošću dobivanja stupnja magistra i na kraju i titule doktora. Na poslijediplomskom studiju se od svakog laboratorijskog stručnjaka s visokim obrazovanjem i/ili specijalizacijom očekuje da sudjeluje u obveznim predmetima i da u petogodnišnjem razdoblju sakupi određeni broj ECTS bodova (program za cjeloživotno učenje). Na našem diplomskom studiju kliničke biokemije naglasak stavljamo na temeljno razumijevanje patobiokemijskih procesa i tumačenje nalaza te se ne usredotočavamo previše na tehničke detalje. Ti su predmeti obavezni, osiguravaju dobar početak budućeg rada te predstavljaju očiglednu korist za bolesnike.

Mislimo da je laboratorijska medicina primarno još uvijek medicinska struka. Međutim, laboratorijski stručnjaci s ne-medicinskim obrazovanjem dobijaju sve više mjesta u kliničkom laboratoriju te su izvanredni partneri u radu. Imaju isto obrazovanje kao doktori medicine: završenu specijalizaciju i doktorski studij. Podučavanje kliničke biokemije na razini diplomskog studija ima za glavni cilj davanje uvida u ispravno tumačenje nalaza i savjeta da se medicinski liječnici trebaju savjetovati s laboratorijskim stručnjacima kada imaju poteškoća u donošenju odluka.

e-pošta: koszegit@freemail.hu

In Hungary, at the postgraduate level clinical laboratory specialization is based traditionally on medical education. However, during the last decades an increasing number of people from other fields of education have joined the staff of clinical laboratories (e.g. biologists, pharmacists, chemists). At the undergraduate level at University of Pécs, Faculty of General Medicine, Clinical Biochemistry is taught for 4th year medical students in one semester (14 h of lectures and 14 h of practices) in Hungarian, English and German languages. For pharmaceutical students Clinical Biochemistry is taught in the 9th semester in Hungarian (24 h of lectures). At our Faculty of Health Sciences, Medical Laboratory Analyst major presently is a 4-year undergraduate training giving an MSc equivalent diploma. This major also has a distant learning type education with the same outcome.

For medical doctors 5 years of postgraduate training is necessary to obtain a specialty degree in the field of clinical laboratory after passing the specialty exam. A couple of years ago lab experts with non-medical university education have also got the possibility to get a specialty degree in clinical chemistry after a training period and passing the specialty exam. Medical laboratory analysts have a key role in performing, supervising routine laboratory work and improving the quality of it. In the near future (as part of the Bologna process) we would like to establish a Medical Laboratory Researcher major with the possibility for obtaining an MSc and finally a PhD degree. At the postgraduate level, every lab expert with higher education and/or specialty degree is expected to join obligatory training courses and to obtain a certain amount of credit points in 5-year periods (lifelong learning). In our Clinical Biochemistry undergraduate courses we stress the most emphasis on the basic understanding of pathobiochemical processes and interpretation of test results and do not focus too much on the technical details. These courses are obligatory subjects and give a good start for future work and mean obvious benefits for the patients.

We think that Laboratory Medicine is still primarily a medical profession. However, lab experts with non-medical education gain more and more space in the clinical laboratory and are excellent partners in our work. They have the same career as medical doctors: specialty degree and PhD. Teaching Clinical Biochemistry at the undergraduate level has its major benefit in giving a better insight for correct interpretation of test results and suggest that medical doctors should consult with laboratory experts when they have difficulties in decision making.

e-mail: koszegit@freemail.hu

ZR3-5

Aktivno učenje i kritičko mišljenje u visokoškolskoj nastavi – prikaz tehnike suradničkog učenja (slagalica)

Petlevski R

Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Slagalica je jedna od najpoznatijih nastavnih metoda suradničkog učenja. Provođenje suradničkog učenja dio je međunarodnog projekta „Čitanje i pisanje za kritičko mišljenje“ (engl. *Reading and writing for critical thinking*, RWCT).

Primjenom RWCT-a u nastavi ostvaruju se višestruki ciljevi: studenti se potiču na kritičko razmišljanje, preuzimanje odgovornosti za učenje, suradnju pri učenju te ih se osposobljava za cjeloživotno učenje.

Nastava se temelji na ERR okviru (Evokacija, Razumijevanje značenja i Refleksija).

Evokacija – u ovoj fazi nastavnik od studenata traži da razmisle o tome što već znaju o nekoj temi čime se utvrđuje kakvo je predznanje studenata.

Razumijevanje značenja – je faza u kojoj studenti dolaze u dodir s novim informacijama koje bi trebali naučiti.

Refleksija – posljednja faza u kojoj se od studenata traži da razmisle o tome što su naučili u predhodnoj fazi.

Praktični prikaz tehnike suradničkog učenja tzv. slagalice izabrana je zato jer razvija kod studenata vještinu timskog rada, a to je jedna od socijalnih vještina, koja im u budućnosti omogućuje brzo uklapanje u radnu sredinu. Glavna značajka ove tehnike jest da je svaki student u prilici proučiti neki novi dio gradiva i u suradnji s drugim studentima pripremiti vlastito kratko predavanje o tom gradivu koje zatim održava u maloj grupi. Time se svim studentima daje prilika da poučavaju jedni druge o nečem još sasvim nepoznatom što je izuzetno motivirajuće. Ako svatko svoj dio zadatka dobro obavi, onda „slaganjem“ dijelova, u grupama, zajedno prouče i nauče nešto novo.

e-pošta: rpetlevski@pharma.hr

ZR3-5

Active learning and critical thinking in higher education – demonstration a technic of cooperative learning (jigsaw)

Petlevski R

Department of Medical Biochemistry and Haematology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

A jigsaw is one of the most famous teaching methods in cooperative learning. Carrying out the cooperative learning is a part of an international project “Reading and writing for critical thinking”, RWTC.

The following aims are obtained by implementation of RWTC in teaching: students are encouraged to critical thinking, taking over the responsibility for learning, cooperation in learning and they are trained for lifelong learning.

The teaching is based on the ERR framework (Evocation, Realisation of meaning and Reflection).

Evocation – at this stage, a teacher asks students to think about what they already know about some subject, by which student's previous knowledge has been determined.

Realisation of meaning – is a stage in which students get into contact with new information they should learn.

Reflection – the last stage in which students are required to think about what they have learned in the previous stage.

The practical demonstration of the cooperative learning technique, so-called puzzle, has been chosen because it develops the teamwork skill. It is one of social skills which makes possible for students to be included fast in the working environment in future. The main characteristic of this technique is that each student has a chance to study a new part of a lesson and in cooperation with other students to prepare own short lecture about that lesson which is then held in a small group. In this way, all students have the opportunity to teach each other about something completely unknown, which is quite motivating for them. If each student completes his/her task well, by “matching” parts in groups, they study and learn something new.

e-mail: rpetlevski@pharma.hr

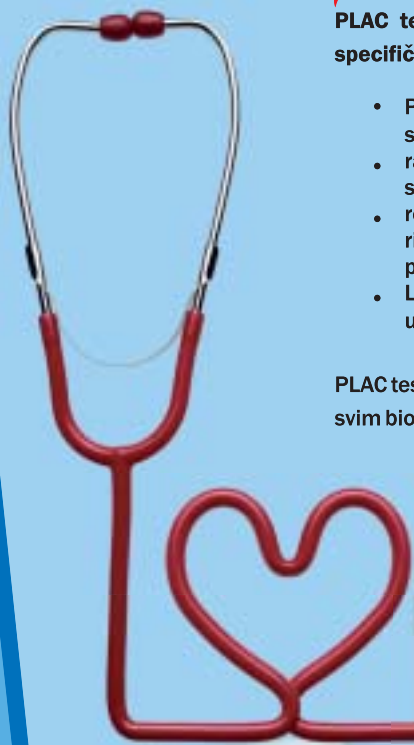
PLAC[®]

Test za Lp-PLA₂

PLAC testom se mjeri koncentracija Lp-PLA₂ (lipoprotein ovisna fosfolipaza A₂) specifičnog biljega upale prisutnog u aterosklerotskim plakovima sklonih rupturi.

- PLAC test za određivanje Lp-PLA₂ je jedini krvni test koji pomaže u detekciji skrivenog rizika srčanog i moždanog udara.
- rana detekcija i agresivnija terapija može uvelike doprinjeti prevenciji ovih stanja.
- rezultati više od 50 objavljenih studija i članaka priznaju Lp-PLA₂ kao marker rizika kardiovaskularnih oboljenja i u primarnoj i sekundarnoj prevenciji koji pruža više informacija od standardnih faktora rizika.
- Lp-PLA₂ je specifični vaskularni biljeg upale i stoga nije pod utjecajem sistemske upale (infekcije, pušenje, pretilost) kao drugi medijatori upale (npr. hs-CRP).

PLAC test za Lp-PLA₂ je turbidimetrijska imunokemijska metoda i može se primjeniti na svim biokemijskim analizatorima, Hitachi, Roche i Olympus.



dia~~D~~exus



 multiplate[®]

tromboelastometrija
 ROTEM[®]



 ventus
M E D I C A L

Petrovaradinska 1 • 10000 Zagreb • Hrvatska
Tel.: +385 (0)1 4662 234 • Fax: +385 (0)1 4662 306
ventus@ventus-medical.hr • www.ventus-medical.hr

P01 – Akreditacija, organizacija i upravljanje laboratorijem

P01-1 (Usmeno priopćenje)

Kako osigurati usporedivost rezultata ispitivanja s dva analitička sustava?

Miler M, Šimundić AM, Štefanović M, Ferenec-Ružić D, Kvaternik M, Topić E, Vrkić N

Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Uvod: Svaki akreditirani laboratorij prema normi HRN EN ISO 15189 obavezan je osigurati ovjeru usporedivosti rezultata, ukoliko se ispitivanja provode različitim postupcima ili opremom. Usporedivost je važna, jer osigurava brzo i kvalitetno izdavanje rezultata neovisno o funkcionalnosti jednog od analizatora što je bitno za dobrobit pacijenta. Cilj ovog rada je prikazati model kojim se u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničke bolnice Sestre milosrdnice na dnevnoj razini osigurava usporedivost rezultata hitnih pretraga s analizatora Olympus AU 2700 i AU 640.

Materijali i metode: Kao referentni analizator korišten je Olympus AU2700, a analizator Olympus AU640 upotrijebljen je za usporedbu rezultata.

Komercijalno dostupni kontrolni uzorci Olympus Control serum 1 i 2 (Olympus, Hamburg, Njemačka) upotrijebljeni su za pretrage: ALT, AMIL, AST, ukupni, direktni i indirektni bilirubin, Ca, CK, CK-MB, Cl, glukoza, K, kreatinin, LDH, Na, ukupni proteini i ureja. Koncentracija CRP određivana je iz komercijalno dostupnih kontrolnih uzoraka ITA Control serum level 1 i 2, a aktivnost amilaze i koncentracija glukoze u mokraći određivane su iz komercijalno dostupnih kontrola Urine chemistry control 1 i 2 (Bio-Rad Laboratories, Irving, CA, SAD).

Rezultati su uspoređivani tijekom reprezentativnog perioda od 60 dana.

Odstupanja usporednog analizatora od referentnog računata su prema jednadžbi: $(100 - (\text{koncentracija AU640} / \text{koncentracija AU2700}) \times 100)$. Vrijednosti za odstupanja izražene su u postotcima, a najveća dopuštena odstupanja određena su prema kriteriju za vanjsku procjenu kvalitete HDMB-a.

Rezultati: Prosječno odstupanje za sve pretrage kretalo se u rasponu od 0% do najviše 16,5% za niske vrijednosti kontrolnih uzoraka, a za visoke vrijednosti od 0-12%. Kod niskih vrijednosti u prosjeku je najviše odstupala koncentracija direktnog bilirubina (4,2%), a najmanje je odstupala koncentracija Na (1,2%). Aktivnost CK-MB najviše je odstupala (4,6%) u mjernom području visokih vrijednosti, a najmanje je od referentnog analizatora odstupala koncentracija Cl (1,0%) izmjerena na usporednom analizatoru. Sva odstupanja bila su unutar dopuštenih granica.

P01 – Accreditation, organization and laboratory management

P01-1 (Oral presentation)

How to provide comparability of results from two analytical systems?

Miler M, Šimundić AM, Štefanović M, Ferenec-Ružić D, Kvaternik M, Topić E, Vrkić N

University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Introduction: Each accredited laboratory according to HRN EN ISO 15189 standard should provide comparability of results if the examinations are performed using different procedures or equipment. The comparability is relevant because allows fast and accurate results reporting regardless to the analytical system used, to the best for the patient care.

The aim of this study was to present a model in University Department of Chemistry, Sestre milosrdnice University hospital, which provides emergency tests results comparability of Olympus AU 2700 and AU 640 analyzers on daily basis.

Materials and methods: Olympus AU2700 served as the reference analyzer, and Olympus AU640 for the comparison of the results.

Commercially available control samples Control serum 1 and 2 (Olympus, Hamburg, Germany) were used for the following analytes: ALT, AMIL, AST, total and direct bilirubin, Ca, CK, CK-MB, Cl, glucose, potassium, creatinin, LDH, sodium, total protein, urea. CRP concentration was determined from commercially available control ITA Control serum level 1 and 2, and urine amylase and glucose were determined from Urine chemistry control 1 and 2 (Bio-Rad Laboratories, Irving, CA, USA). Results were compared during the representative period of 60 days.

The biases of comparative analyzer were calculated according to the following equation: $(100 - (\text{concentration AU640} / \text{concentration AU2700}) \times 100)$. Values are expressed as percentages with maximum allowed bias defined according to Croatian Society of Medical Biochemists external quality assessment criteria. All observed biases were within the acceptance limits.

Results: Average biases for all analytes ranged from 0% to maximum 16.5% for low control samples, and between 0 and 12% for high controls.

The highest bias in low levels control samples was observed in direct bilirubin (4.2%) and minimum bias in Na (1.2%). In high controls, CK-MB activity bias was the largest (4.6%) and Cl the smallest (1.0%).

Zaključak: Našim modelom omogućeno je trajno osiguravanje usporedivosti i analitičke kvalitete rezultata hitnih laboratorijskih pretraga.

e-pošta: marijana.miler@gmail.com

P01-2 (Usmeno priopćenje)

Analiza laboratorijskog vremena izrade pretraga u hitnom biokemijskom laboratoriju

Nikolac N, Šimundić AM, Čipak A, Štefanović M, Vukasović I, Vrkić N
Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Uvod: Osiguravanje prihvatljivog TAT-a (engl. *turn-around-time*) i njegovo kontinuirano praćenje neophodno je za učinkovitu skrb za bolesnika i u hitnom ga je laboratoriju potrebno održavati unutar 1 sata. Informatizacija laboratorijskih i bolničkih procesa, kao i uvođenje sustava praćenja i izvještavanja o TAT-u trebali bi smanjiti vrijeme izrade analiza.

Cilj: U ovom smo istraživanju ispitali postoji li razlika u vremenu izrade analiza u hitnom biokemijskom laboratoriju akreditiranom prema HRN EN ISO 15189 u tri jednomjesečna razdoblja: početnom periodu (razdoblje I., rujan 2008.), nakon uvođenja bolničkog informacijskog sustava u dijelu bolničkih odjela (razdoblje II., siječanj 2009.) te nakon uspostavljanja sustava izvještavanja o TAT-u unutar laboratorija (razdoblje III., travanj 2009.).

Materijali i metode: Podatci o TAT-u sakupljeni su za hitni biokemijski laboratorij pomoću aplikacije vlastite izrade načinjene u programu Microsoft Access 2003. Praćeni parametri su: ukupan broj uzoraka, srednje vrijeme izrade analiza, srednje vrijeme prekoračenja TAT-a i broj uzoraka koji je prekoračio TAT.

Rezultati: Ukupan broj uzoraka u razdobljima I., II. i III. bio je: 10.816, 11.354 i 10.570. Prosječno vrijeme izrade analiza bilo je 42, 43 i 38 minuta, a prosječno vrijeme prekoračenja 21, 22 i 16 minuta. Ukupan broj uzoraka koji su prekoračili TAT bio je: 910 (8,4%), 951 (8,4%) i 715 (6,8%). Postojala je statistički značajna razlika u broju uzoraka sa prekoračenim TAT-om ($P < 0,001$; hi-kvadrat). Naknadno testiranje je pokazalo da nije bilo statistički značajne razlike između razdoblja I. i II., dok je u razdoblju III. bilo statistički značajno manje prekoračenja u odnosu na prethodna dva razdoblja ($P < 0,001$; z-test).

Zaključak: Uvođenje bolničkog informacijskog sustava nije statistički značajno smanjilo laboratorijsko vrijeme izrade analiza, dok je smanjenje zabilježeno nakon uspostave aplikacije za praćenje i izvještavanje o TAT-u unutar laboratorija.

e-pošta: nora.nikolac@gmail.com

Conclusions: Our model continuously provides comparability and analytical quality of emergency laboratory test results.

e-mail: marijana.miler@gmail.com

P01-2 (Oral presentation)

Turn-around-time in emergency biochemistry laboratory

Nikolac N, Šimundić AM, Čipak A, Štefanović M, Vukasović I, Vrkić N
University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Introduction: Assuring and continuous monitoring of turn-around-time (TAT) is essential for adequate patient care and should be kept under 1 hour in emergency laboratories. Automation and informatization of work processes in hospitals and laboratories should decrease laboratory TAT. Careful monitoring and reporting of TAT should have the same effect.

Aim: We aimed to investigate whether there is a difference in TAT in emergency biochemistry laboratory accredited according to standard HRN EN ISO 15189 in three different periods: initial period (period I., September 2008), after implementing hospital information system in some hospital wards (period II., January 2009) and after implementing system of daily reports on TAT within laboratory (period III., April 2009).

Materials and Methods: Data on TAT for emergency biochemistry laboratory are collected using self-made application in Microsoft Access 2003 program. Recorded parameters were: total sample number, average TAT, average TAT excess and proportion of samples that exceeded TAT (number of outliers).

Results: Total sample number in periods I., II. and III. was 10,816, 11,354 and 10,570. Average TAT was 42, 43 and 38 minutes and average TAT excess was 21, 22 and 16 minutes. Total number of outliers was: 910 (8.4%), 951 (8.4%) and 715 (6.8%). There was a statistically significant difference in number of outliers ($P < 0.001$; Chi-square). Post hoc testing revealed that there was no difference between periods I. and II., while there was significantly less outliers in period III. ($P < 0.001$; z-test).

Conclusion: Implementing of hospital information system did not decrease laboratory turn-around-time; however the decrease is recorded after implementing application for reporting on TAT within laboratory.

e-mail: nora.nikolac@gmail.com

P01-3

Točka pokrića specijalističkog medicinsko-biokemijskog laboratorija u stvarnom modelu i simuliranom povećanjem obujma pretraga

Buljanović V¹, Patajac H², Petrovečki M³

¹Opća županijska bolnica, Našice

²Adris grupa d.d, Rovinj

³Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci i Klinička bolnica Dubrava, Zagreb

Uvod: Točka pokrića laboratorija jest ekonomski izraz koji označuje obujam pretraga izražen udjelom u kojem prihodi podmiruju troškove. U točki pokrića dobit je nula, tj. nema ni zarade niti gubitka.

Ako se točka pokrića odredi u modelu jedne poslovne godine, onda ju je moguće prikazati u simuliranom modelu istoga razdoblja, ali s mogućim povećanjem kapaciteta rada.

Na taj se način dodaje poslovna dimenzija u radu laboratorija.

Metode: U promatranom modelu specijalističkog medicinsko-biokemijskog laboratorija napravljena je ekonomska analiza točke pokrića za 2007. godinu. Za izračun je potrebno pronaći onu razinu prihoda na kojoj se pokrivaju troškovi poslovanja, odnosno kada je dobit jednaka nuli. Prihodi predstavljaju ostvarenu naknadu za obavljene analize, a troškovi sve potrebne resurse.

Rezultati: Laboratorij je u 2007. godini ostvario ukupni prihod 6,15 mil. kn. Točka pokrića za 2007. godinu nalazi se na 83% obujma trenutnog poslovanja. To konkretno znači da laboratorij mora ostvariti 5,10 mil. kn prihoda da bi bio u zoni pozitivnog poslovanja. Obujam posla u laboratoriju može se realno povećati za 10%, u tom slučaju prihod je 6,77 mil. kn i tada se točka pokrića od 5,1 mil. kn nalazi na 76% maksimalnog obujma poslovanja.

Zaključak: Točka pokrića od 76% je u području velikog udjela iskorištenja. Taj udio pokazuje da je potrebno veliko iskorištenje rada laboratorija kako bi se ostvario pozitivan rezultat. Također, dovoljan je relativno mali pomak u smanjenju obujma analiza da poslovanje postane nepovoljnije, tj. da laboratorij ostvari negativan rezultat. U slučaju da je laboratorij na tržištu teško bi izdržao utjecaj konkurencije u uvjetima pada obujma posla.

e-pošta: vikica.buljanovic@os.t-com.hr

P01-3

Break-even analysis for a clinical biochemistry laboratory with a real model and simulated model of increased laboratory test volume

Buljanović V¹, Patajac H², Petrovečki M³

¹General Hospital Našice, Našice, Croatia

²Adris group d.d, Rovinj, Croatia

³University School of Medicine, Rijeka and Dubrava Clinical Hospital in Zagreb, Croatia

Introduction: A break-even point for a biochemistry laboratory is an economic expression referring to the volume of testing at which laboratory revenues equal expenses and the profit is zero. In other words, gains equal losses. If a break-even point is determined for the volume of a clinical laboratory testing within one-year period, then it may also be determined in a simulated model of increased volume of testing over the same period of time. It is a business aspect of laboratory work.

Methods: A specialized clinical biochemistry laboratory was used as a model for a break-even analysis for 2007. To carry out the analysis, the revenue that covered the expenses had to be determined. At that point, the gain equaled zero. Laboratory test fees were the revenues, whereas the resources needed to operate the laboratory were the expenses.

Results: In 2007, the total laboratory revenue was 6.15 million HRK. The break-even point was achieved at 83% of the current volume of business. It meant that the laboratory had to make 5.10 million HRK in revenue to break even. The volume of laboratory work could be realistically increased by 10%. In case of the 10% increase in the volume of work, the revenue would amount to 6.77 million HRK and the break-even point would be achieved at 76% of the maximum volume of business.

Conclusion: The break-even point of 76% falls within the area of high proportion of utilization. This proportion shows that high utilization of laboratory work is needed to achieve positive results. It also shows that a relatively small decrease in the volume of laboratory tests would produce negative business results. If the laboratory services were offered on the market, the laboratory would be unlikely to withstand the pressure of competition if its volume of work decreased.

e-mail: vikica.buljanovic@os.t-com.hr

P02 – Kardio- i cerebrovaskularne bolesti

P02-1 (Usmeno priopćenje)

Utjecaj koncentracije feritina i CRP na aterogeni indeks

Jadrić R¹, Hasić S¹, Kiseljaković E¹, Ćorić J², Huskić J¹,
Winterhalter-Jadrić M¹

¹Zavod za fiziologiju i biokemiju, Medicinski fakultet, Sarajevo, Bosna i Hercegovina

²Zavod za kliničku kemiju i biokemiju, KUC Sarajevo, Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Uvod: Istražili smo koncentraciju feritina i C-reaktivnog proteina (CRP) te njihovu povezanost kao biljega kardiovaskularnih bolesti.

Materijali i metode: Ispitanici su bili dobrovoljni davaoci krvi, podijeljeni u skupine prema starosti i spolu. Kao kontrolnu skupinu postavili smo trudnice. Uzorci krvi sakupljeni su venupunkturom te analizirani kako bi se odredila koncentracija feritina i CRP te se izračunao aterogeni indeks iz lipidnog profila bolesnika.

Rezultati: Izmjerali smo niže vrijednosti koncentracije feritina u podskupini plodnih žena sa statistički značajnim razlikama između skupina muškaraca i žena iste dobi, kao i kod usporedbe sa skupinom žena u menopauzi. Koncentracija feritina nije bila u statistički značajnoj vezi s koncentracijom CRP, no kod bolesnika s visokom koncentracijom feritina bilo je vjerojatnije da će im i koncentracija CRP biti visoka. Svi bolesnici s visokom koncentracijom CRP imali su i viši aterogeni indeks.

Zaključak: Naši rezultati naglašavaju važnost praćenja koncentracije feritina i CRP kao parametara koji utječu na buduće kardiovaskularne događaje.

e-pošta: rjadric@hotmail.com

P02-2 (Usmeno priopćenje)

Vrijednost određivanja proteina S100 kod akutnog cerebrovaskularnog inzulta

Horvat V¹, Jurić S¹, Butković-Soldo S¹, Mandić D²,
Mandić S¹, Majetić-Cetina N¹

¹Odjel za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Klinička bolnica Osijek, Osijek

²Zavod za javno zdravstvo Osječko-Baranjske Županije, Osijek

Uvod: Protein S100 je kiseli protein koji veže kalcij, a glavna je strukturna komponenta citosola uglavnom astrog-

P02 – Cardio- and cerebrovascular diseases

P02-1 (Oral presentation)

Influence of ferritin and CRP concentration on atherogenic index

Jadrić R¹, Hasić S¹, Kiseljaković E¹, Ćorić J², Huskić J¹,
Winterhalter-Jadrić M¹

¹Institute for Physiology and Biochemistry, Medical Faculty Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

²Institute for Clinical Chemistry and Biochemistry, Clinical Centre University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Introduction: We have investigated ferritin and C-reactive protein levels and their relation as cardiovascular disease risk markers.

Material and methods: Patients were blood donors, divided in groups by age and gender, and pregnant women as a control. Blood samples were collected by venepuncture, and assayed for ferritin and CRP level determination, with atherogenic index calculated from patient's lipid profile.

Results: We obtained lower ferritin values in fertile women subgroup, with significant differences between male and female groups of same age, as well as when compared to women in menopause. Ferritin levels were not significantly linked with CRP concentration, but patients with high ferritin were more likely to have high CRP concentration. At the same time, all patients with high CRP had higher atherogenic index.

Conclusion: Our results are emphasizing the importance of ferritin and CRP concentration monitoring, as parameters influencing future cardiovascular events.

e-mail: rjadric@hotmail.com

P02-2 (Oral presentation)

Protein S100 determination in acute cerebrovascular insult

Horvat V¹, Jurić S¹, Butković-Soldo S¹, Mandić D²,
Mandić S¹, Majetić-Cetina N¹

¹Department for Clinical Laboratory Diagnostics, Osijek University Hospital, Osijek, Croatia

²Institute of Public Health for Osijek-Baranya County, Osijek, Croatia

Introduction: S100 protein is acidic calcium-binding protein which is main structural component of cytosol,

lijalnih stanica. Strukturno cerebralno oštećenje dovodi do oslobađanja tog proteina u cerebrospinalnu tekućinu i krv. Cilj ove preliminarne prospektivne studije bio je ispitati vrijednost ranog određivanja S100 proteina u akutnom cerebrovaskularnom inzultu (ICV).

Materijali i metode: Ispitano je 35 bolesnika (14 muškaraca i 21 žena) u dobi od 58 do 88 godina koji su primljeni na Kliniku za neurologiju, Kliničke bolnice Osijek sa simptomima akutnog cerebrovaskularnog inzulta (ICV). Unutar 24 sata od pojave simptoma učinjen je CT mozga te je uzet uzorak krvi. Koncentracija S100 proteina izmjerena je ECLIA metodom na Elecsys 2010 (ROCHE) imunokemijskom analizatoru. Za kontrolnu skupinu izabrana su 33 ispitanika (15 muškaraca i 18 žena) u dobi od 45 do 81 godine, koji nisu neurološki pacijenti. Usporedili smo koncentracije S100 proteina kod pacijenata s dijagnozom akutnog ICV s kontrolnom skupinom. Rezultati su obrađeni Mann-Whitney Rank Sum testom.

Rezultati: Bolesnici s akutnim ishemijskim cerebrovaskularnim inzultom imali su statistički značajnu veći medijan vrijednosti S-100 u serumu u odnosu na kontrolnu skupinu ($P = 0,002$), a manji u odnosu na pacijente s akutnim hemoragijskim cerebrovaskularnim inzultom ($P = 0,003$). Rani CT mozga potvrdio je ishemiju samo kod manjeg broja pacijenata.

Zaključak: Obzirom da se rane ishemijske promjene često ne uočavaju na CT-u u prvih 24 sata čini se da bi protein S100 mogao biti koristan serumski biljeg akutnog ishemijskog cerebrovaskularnog inzulta.

e-pošta: phorvat.vesna@gmail.com

P02-3

Povezanost koncentracije mijeloperoksidaze s dobi i spolom

Mladina B, Šupe Domić D, Stanišić L, Čepić K, Dujmov I

Klinički bolnički centar Split, Split

Uvod: Mijeloperoksidaza (MPO) je hemoprotein smješten u azurofilnim granulama polimorfonuklearnih neutrofila i makrofaga te izlazi u ekstracelularnu tekućinu za vrijeme upalnog procesa stvarajući oštećenja na mjestu upale. MPO je nađena u aterosklerotičnom plaku čija koncentracija ukazuje na tijek bolesti kod pacijenata s prisutnom boli u prsima. Stoga bi se MPO trebala koristiti uz povijest bolesti, EKG i srčane biomarkere kako bi pomogla pri odluci o daljnjim dijagnostičkim i terapijskim postupcima.

Cilj: Cilj ovoga rada bio je ispitati koncentraciju MPO kod zdravih ispitanika na području splitsko-dalmatinske župa-

mainly astroglia cells. Structural cerebral damage leads to releasing of that protein in cerebrospinal fluid and blood-stream. Aim of this preliminary prospective study was to investigate value of early determination of serum S-100 protein in acute ICV.

Materials and methods: 35 patients (14 men and 21 women), aged 58-88 years, admitted to Neurology Clinic of Clinical Hospital Osijek with symptoms of acute ICV were investigated. Within 24 hours from onset of symptoms on all patients we performed brain CT and collected blood sample. S100 protein concentration was measured using ECLIA method on Elecsys 2010 (ROCHE) system for immunochemical analyses. 33 subjects (15 men and 18 women), aged 45-81 years, who were not neurological patients were chosen for control group. We compared S100 concentration in acute ICV patient with those in control group. Results were analyzed with Mann-Whitney Rank Sum test.

Results: Patients with acute ischemic ICV had statistically significant higher median of S100 serum values ($P = 0.002$), compared to S100 values of control group, but lower ($P = 0.003$) compared to patients with acute hemorrhagic ICV. Early brain CT confirmed ischemic ICV only on minority of patients.

Conclusion: Considering that early ischemic changes in brain are rarely noticeable on CT within first 24 hours from onset of symptoms, it seems that determination of serum S100 could be useful in acute ischemic ICV diagnostic.

e-mail: phorvat.vesna@gmail.com

P02-3

Correlation between concentration of myeloperoxidase with age and sex

Mladina B, Šupe Domić D, Stanišić L, Čepić K, Dujmov I

Split University Hospital Center, Split, Croatia

Introduction: Myeloperoxidase (MPO) is a hemoprotein stored in azurophilic granules of polymorphonuclear neutrophils and macrophages and released into extracellular fluid in the setting of inflammatory process and promotes oxidative damage. MPO has been detected in atherosclerotic plaques and plasma MPO levels have been shown to be a predictor of major adverse cardiac events in patients presenting with chest pain to the emergency room. Therefore MPO is to be used in conjunction with clinical history, ECG and cardiac biomarkers to evaluate patients presenting with chest pain who are at risk for

nije te utvrditi postoji li povezanost između koncentracije MPO i dobi ispitanika.

Ispitanici i metode: Odredili smo koncentraciju MPO u 73 uzorka zdravih ispitanika i to kod 33 muškarca (u dobi od 29 do 81 godine) i 40 žena (u dobi od 24 do 79 godina). Koncentraciju MPO u plazmi odredili smo kemiluminiscentnom analizom sa mikročesticama (CMIA) na analizatoru Architect i1000SR firme ABBOT.

Rezultati: Dobivene vrijednosti koncentracije MPO za žene su $89,8 \pm 89,6$ pmol/L, a za muškarce $87,6 \pm 74,9$ pmol/L. Uspoređivanjem vrijednosti koncentracije MPO s godinama kod žena dobili smo koeficijent korelacije $r = 0,07$; $P = 0,659$, dok je kod muškaraca koeficijent korelacije $r = -0,26$; $P = 0,137$.

Zaključak: Koncentracije MPO dobivene u našem laboratoriju u užem su rasponu od referentnih vrijednosti koje navodi proizvođač, što ukazuje na utjecaj vanjskih čimbenika kao što su podneblje, ishrana, uvjeti okoliša, te životne navike. Prema našim rezultatima nije pronađena povezanost koncentracije MPO s dobi kod žena i muškaraca.

e-pošta: blanka.mladina@kbsplit.hr

major adverse cardiac events, including myocardial infarction, need for revascularization or death.

Aim: The aim of this study was to test concentration of MPO in a healthy subject in the County of Split - Dalmatia and to find out if there is a correlation between the MPO concentration and subjects' age and sex.

Patients and methods: The sample consisted of 73 healthy subjects, 33 male (aged from 29 to 81) and female (aged from 24 to 79). MPO concentration is measured in human EDTA plasma by chemiluminiscent microparticle immunoassay on Architect i1000SR (CMIA) company ABBOTT.

Results: The observed values for MPO concentration for women are 89.8 ± 89.6 pmol/L and for men 87.6 ± 74.9 pmol/L. Comparing MPO concentration with women's age we have found correlation coefficient $r = 0.07$; $P = 0.659$, and with men's age $r = -0.26$; $P = 0.137$.

Conclusion: Concentration for MPO that we have found in our laboratory is in narrower range from reference range of the manufacturer. It indicates that external factors as climate, nutrition, environmental conditions and life habits influence on the results. According to our results neither subjects' sex nor ages are related to MPO concentration.

e-mail: blanka.mladina@kbsplit.hr

P02-4

Biokemijski biljezi oštećenja miokarda na modelu štakora

Hasic S, Jadrić R, Kiseljaković E, Winterhalter-Jadrić M

Zavod za fiziologiju i biokemiju, Medicinski fakultet, Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Uvod: Ovo istraživanje provedeno je s ciljem utvrđivanja mogu li srčani troponin T (cTnT) i mioglobulin otkriti oštećenje miokarda kod štakora izazvan uzimanjem isoproterenola (ISO).

Materijali i metode: 24 štakora ($N = 24$) je podijeljeno u četiri skupine: kontrolna ($N = 8$), ISO I ($N = 8$), ISO II ($N = 8$) i ISO III skupina ($N = 8$). Odraslim Wistar štakorima, albino mužjacima dana je pojedinačna doza od 250 mg/kg kako bi se izazvalo oštećenje miokarda. Štakorima kontrolne grupe dana je fiziološka otopina. ECLA imunokemijskom metodom izmjerena je koncentracija srčanog troponina T i mioglobulina u serumima štakora kontrolne grupe i 30, 60, 120 minuta nakon primanja ISO. Dobiveni podaci analizirani su dvosmjernim testom i Studentovim t-testom. Statistička značajnost postavljena je na 0,05.

P02-4

Biochemical markers of myocardial damage in rat model

Hasic S, Jadrić R, Kiseljaković E, Winterhalter-Jadrić M

Institute for Physiology and Biochemistry, Medical Faculty Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Introduction: This study was performed to determine whether cardiac troponin T (cTnT) and myoglobin could detect rat myocardial damage induced by isoproterenol (ISO) application.

Material and method: Twenty-four rats ($N = 24$) were divided into four groups: control ($N = 8$), ISO I group ($N = 8$), ISO II group ($N = 8$), and ISO III group ($N = 8$). ISO, single, i.p. dose 250 mg/kg was given to male, adult, albino, Wistar rats to induce myocardial damage. Saline was administered to rats of control group. Cardiac TnT and myoglobin were measured by ECLA sandwich immunoassay in rat sera of control group and 30, 60 and 120 minutes after ISO application. Obtained data were analysed by two-tail, unpaired Students' t-test. Significance was set at 0.05.

Rezultati: Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD). Srednja vrijednost koncentracije cTnT u krvi bila je statistički značajno povišena kod svih ISO skupina. Između ISO skupina nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji cTnT ($P < 0,05$). Primjećeno je statistički značajno povišenje koncentracije mioglobulina u krvi kod ISO III skupine u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P < 0,05$). Između ISO skupina nije bilo statistički značajnih razlika u koncentraciji mioglobulina u krvi.

Zaključak: Istraživanje je pokazalo da upotrebljena doza ISO od 250 mg/kg kod štakora izaziva oštećenje miokarda. Mioglobulin je pokazao slabiju osjetljivost vjerojatno uslijed svog brzog protoka i uklanjanja iz organizma kroz bubrege.

Results: Results are reported as mean $\pm$ SD. Mean cTnT blood value was significantly increased in all ISO groups. Between ISO groups there were significant differences in cTnT blood level ($P < 0.05$). Significant increase of blood myoglobin value was in ISO III group in comparison with control ($P < 0.05$). Between ISO groups there were not significant differences in myoglobin blood level.

Conclusions: This study showed that applied dose of ISO 250 mg/kg induced rat myocardial damage. Cardiac TnT is sensitive, specific biomarker of rat myocardial damage. Myoglobin showed poorer sensitivity probably through its rapid kinetic and elimination through kidneys.

e-mail: sabahetahasic@yahoo.com

e-pošta: sabahetahasic@yahoo.com

P02-5

Leptin i male, guste LDL čestice

Vogrinc Ž, Trbojević-Čepe M, Ljubić H, Sertić J

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: Leptin je peptidni hormon porijeklom iz adipocita koji ima važnu ulogu u regulaciji hranjenja te potrošnje energije u tijelu. Koncentracija leptina u krvi proporcionalna je količini masnog tkiva i značajno je povišena kod pretilih osoba. Zbog različitih potencijalno proaterogenih djelovanja u koje je leptin uključen kao npr. indukcija disfunkcije endotela ili promocija oksidativnog stresa, istražuje se uloga leptina kao mogućeg rizičnog čimbenika za nastanak i razvoj ateroskleroze. U radu je ispitivana povezanost između serumskih koncentracija leptina i pojave malih, gustih LDL čestica koje predstavljaju važan rizični čimbenik za nastanak ateroskleroze s ciljem da se utvrdi imaju li promjene u koncentraciji leptina utjecaja na stvaranje malih LDL čestica.

Materijali i metode: Skupini ispitanika sa sumnjom na metabolički sindrom i dokazanom dislipidemijom ($N = 52$) napravljena fenotipizacija LDL čestica i određene su koncentracije leptina u serumu. Fenotipizacija LDL čestica je napravljena elektroforetskom metodom na gradijntnom poliakrilamidnom gelu razvijenom u našem laboratoriju, a koncentracije leptina određivane su komercijalnom metodom ELISA (Mediagnost, Njemačka). Kontrolnu skupinu su činile 54 zdrave osobe s koncentracijama lipidnih parametara unutar preporučenih vrijednosti, te normalnom distribucijom veličina LDL čestica.

P02-5

Leptin and small, dense LDL particles

Vogrinc Ž, Trbojević-Čepe M, Ljubić H, Sertić J

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of Medicine and Clinical Hospital Center, Zagreb, Croatia

Background: Leptin, a peptide hormone secreted by the adipose tissue is primarily involved in the regulation of food intake and energy expenditure. Plasma leptin concentration is proportional to body adiposity and is markedly increased in obese individuals. Leptin exerts many potentially atherogenic effects such as induction of endothelial dysfunction, stimulation of inflammatory reaction, oxidative stress, proliferation of vascular smooth muscle cells etc. We investigated the relationship between serum leptin levels and the occurrence of small dense LDL particles (pattern B) to evaluate the possible influence of this adipokine on LDL particle size distribution.

Materials and methods: We determined serum leptin concentrations in group of 52 dyslipidemic subjects with visceral adiposity and related metabolic syndrome, and in a group of 54 healthy blood donors with normal lipid profile and normal distribution of LDL particle size. Serum leptin concentrations were determined by commercially available ELISA test (Mediagnost, Germany). LDL particle size determination was performed by gradient polyacrylamide gel electrophoresis developed in our laboratory.

Results: Pathologic LDL phenotype (LDL phenotype B) was detected in 27/52 dyslipidemic patients, and the

Rezultati: U skupini osoba s dislipidemijom kod 27/52 dokazan je i patološki LDL fenotip B. Prosječne koncentracije serumskog leptina u ovoj podskupini ispitanika iznosile su 14,5 ug/L i bile više u odnosu na kontrolnu skupinu (8,1 ug/L), ali i u odnosu na čitavu skupinu dislipidemičnih osoba (11,4 ug/L).

Zaključak: Više vrijednosti leptina u skupini ispitanika s LDL fenotipom B ukazuju na moguću povezanost leptina s mehanizmima koji dovode do nastanka malih LDL čestica.

e-pošta: zvogrinc@kbc-zagreb.hr

mean value of leptin concentrations in this selected subgroup of patients was 14.5 ug/L. The mean value of leptin concentrations in the whole group of dyslipidemic patient was 11.4 ug/L and in the group of controls it was 8.1 ug/L.

Conclusions: The higher levels of leptin in selected subgroup of patients with LDL phenotype B suggest that this adipokine could be involved in mechanisms of the small, dense LDL particles production.

e-mail: zvogrinc@kbc-zagreb.hr

P02-6

Povezanost koncentracija C-reaktivnog proteina i arterijskog ishemijskoga moždanog udara u djece

Coen Herak D¹, Miloš M¹, Leniček Krleža J²,
Zrinski Topić R³, Dodig S³, Zadro R¹

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

²Zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinika za dječje bolesti, Zagreb

³Odjel za kliničko laboratorijsku dijagnostiku, Dječja bolnica Srebrnjak, Zagreb

Uvod: Povišene koncentracije C-reaktivnog proteina visoke osjetljivosti (hs-CRP) su povezane s povećanim rizikom za aterosklozu u odraslih. Za razliku od toga, podatci za djecu su nedostadni, što nas je navelo na ispitivanje moguće povezanosti koncentracija hs-CRP i arterijskog ishemijskoga moždanog udara (AIS) u djece.

Materijali i metode: U istraživanje je uključeno 41 djeteta (25 dječaka, 16 djevojčica) starosne dobi < 18 godina s utvrđenom dijagnozom AIS, svrstanih u 2 skupine, dječji AIS (N = 21) i perinatalni/neonatalni AIS (N = 20). Kontrolnu skupinu je predstavljalo 56 zdrave djece (36 dječaka, 20 djevojčica) starosne dobi 2-17 godina. Koncentracije hs-CRP su izmjerene imunonefelometrijskom metodom s česticama lateksa (CardioPhase hsCRP, Siemens Medical Solutions Diagnostics).

Rezultati: Uporabom granične vrijednosti od 0,84 mg/L (90 percentila) dobivena je statistički značajna razlika povišenih vrijednosti hs-CRP (P = 0,014) u skupini djece s AIS (29,3%) u odnosu na kontrolnu skupinu (8,9%). Iako je medijan vrijednosti hs-CRP bio dvaput viši u skupini dječjeg AIS (0,47 mg/L) u odnosu na kontrolnu skupinu (0,22 mg/L), nije dobivena statistički značajna razlika (P = 0,154). Vrijednosti medijana hs-CRP nisu se statistički značajno razlikovale (P = 0,784) između skupine dječjeg AIS (0,47 mg/L) i skupine djece s perinatalnim/neonatalnim

P02-6

Association between C-reactive protein and arterial ischemic stroke in children

Coen Herak D¹, Miloš M¹, Leniček Krleža J²,
Zrinski Topić R³, Dodig S³, Zadro R¹

¹Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of Medicine and Clinical Hospital Center, Zagreb, Croatia

²Department of Laboratory Diagnosis, Children's Hospital Zagreb, Zagreb, Croatia

³Department of Clinical Laboratory Diagnosis, Srebrnjak Children's Hospital, Zagreb, Croatia

Introduction: Increased concentrations of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) are associated with increased risk for atherothrombotic disease in adults, but limited data are available in children. This prompted us to investigate the possible association between hs-CRP concentrations and arterial ischemic stroke (AIS) in children.

Patients and methods: hs-CRP was measured in 41 children (25 boys, 16 girls) aged < 18 years, with an established diagnosis of AIS. Children were classified into 2 groups, childhood AIS (N = 21) and perinatal/neonatal AIS (N = 20). The control group consisted of 56 healthy children (36 boys, 20 girls) aged 2-17 years. CRP was measured by using particle-enhanced immunonephelometry (CardioPhase hsCRP, Siemens Medical Solutions Diagnostics).

Results: By using a cut-off value of 0.84 mg/L (90th percentile), significantly higher frequency of elevated hs-CRP values (P = 0.014) was found in children with AIS (29.3%) than in healthy children (8.9%). A twofold higher median hs-CRP value was identified in childhood AIS (0.47 mg/L) compared to healthy children (0.22 mg/L), but without statistical significance (P = 0.154). Higher median hs-CRP value, although not statistically significant (P = 0.784), was found in childhood AIS (0.47 mg/L) compared to perinatal/neonatal AIS (0.24 mg/L). Moreover, an almost threefold higher median hs-CRP value was identified in

AIS (0,24 mg/L). U skupini djece s AIS približno triput viša vrijednost medijana hs-CRP dobivena je u dječaka (0,47 mg/L) nego u djevojčica (0,16 mg/L), dok je razlika prema spolu bila manje izražena u kontrolnoj skupini (dječaci: 0,26 mg/L, djevojčice: 0,19 mg/L).

Zaključak: Dobiveni rezultati ukazuju na tendenciju povišenih vrijednosti hs-CRP u skupini dječjeg AIS, posebice u dječaka, što može objasniti njihovu češću zastupljenost u dječjem AIS.

e-pošta: desirecoen@yahoo.com

P02-7

Povezanost metaboličkih poremećaja (hiperglikemije, dislipidemije) s hiperurikemijom u općoj populaciji

Kačkov S¹, Šimundić AM², Nikolac N², Bilušić M¹

¹Medicinsko-biokemijski laboratorij, Poliklinika Bonifarm, Zagreb

²Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Uvod: Mokraćna kiselina je povezana s mnogim sastavnicama metaboličkog sindroma, inzulinskom rezistencijom, mikroalbuminurijom, nealkoholnom masnom bolesti jetre i dr. Hiperurikemija je prisutnija u muškaraca i osoba prekomjerne tjelesne težine. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi prevalenciju hiperurikemije i njen odnos s koncentracijom glukoze natašte i lipidnim statusom u općoj populaciji.

Materijali i metode: Ovo retrospektivno istraživanje je obuhvatilo 6.476 ispitanika starijih od 18 godina, koji su upućivani u laboratorij radi rutinskih krvnih pretraga u razdoblju od lipnja 2007. do veljače 2009. U uzorcima krvi koji su prikupljeni natašte određena je koncentracija glukoze, triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola i mokraćne kiseline. Ispitanici su podijeljeni u skupine s normalnim i povišenim koncentracijama mjerenih parametara. Granične vrijednosti za glukozu preuzete su prema kriterijima ATP III, za koncentracije lipida su korištene preporučene vrijednosti, a za mokraćnu kiselinu gornja granica referentnog raspona prema harmoniziranim vrijednostima Hrvatske komore medicinskih biokemičara.

Rezultati: Hiperurikemija je opažena u 13,9% opće populacije i bila je učestalija u muškaraca, nego u žena (26% vs. 6%; $P < 0,001$). Ispitanici sa hiperurikemijom imali su češće povećanu koncentraciju glukoze (9,3% prema 3,7%; $P < 0,001$), triglicerida (46,9% prema 17,6%; $P < 0,001$), ukupnog kolesterola (69,6% prema 51,9%; $P < 0,001$), LDL-kolesterola (64,5% prema 46,4%; $P < 0,001$), HDL-kolesterola

boys than in girls with AIS (0.47 and 0.16 mg/L, respectively), while in healthy children this difference was less pronounced (boys: 0.26 mg/L, girls: 0.19 mg/L).

Conclusions: According to obtained results there is a trend towards increased hs-CRP values in childhood AIS. This was more pronounced in boys and could explain their predominance in childhood AIS.

e-mail: desirecoen@yahoo.com

P02-7

Relationship between metabolic disorders (hyperglycemia, dislipidemia) and hyperuricemia in general population

Kačkov S¹, Šimundić AM², Nikolac N², Bilušić M¹

¹Medical biochemistry laboratory, Polyclinic Bonifarm, Zagreb, Croatia

²University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Abstract: Uric acid is associated with several components of the metabolic syndrome, insulin resistance, microalbuminuria, non-alcoholic fatty liver disease, and some other. Hyperuricemia more frequently occurs in males and overweight persons. The aim of this study was to determine the prevalence of hyperuricemia and its relationship with fasting glucose concentrations and lipid status in general population.

Material and methods: This retrospective study included 6,476 subjects older than 18 years, consecutively referred to our laboratory for routine blood testing, between June 2007 and February 2009. The concentration of glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and uric acid was measured in blood samples collected after an overnight fast. Subjects were divided into subgroups with normal and increased concentrations of measured parameters. Cut-off values were according to the ATP III criteria for glucose, recommended values were used for concentration of lipids, and for uric acid we used the upper limit of reference range according to the harmonized values of the Croatian Chamber of Medical biochemists.

Results: Hyperuricemia prevalence was 13.9% and it was significantly higher in males, than in females (26% vs. 6%; $P < 0.001$). The study subjects with hyperuricemia were often found to have increased values of glucose (9.3% versus 3.7%; $P < 0.001$), triglycerides (46.9% versus 17.6%; $P < 0.001$), total cholesterol (69.6% versus 51.9%; $P < 0.001$), LDL-cholesterol (64.5% versus 46.4%; $P < 0.001$),

la (24,3% prema 13%; $P < 0,001$) u usporedbi s ispitanicima čije su koncentracije mokraćne kiseline u serumu bile unutar referentnog raspona.

Zaključak: Hiperurikemija je povezana s koncentracijom glukoze natašte i dislipidemijom u općoj populaciji.

e-pošta: skackov@bonifarm.hr

HDL-cholesterol (24.3% versus 13%; $P < 0.001$) compared to subjects with serum uric acid levels within the reference range.

Conclusion: Hyperuricemia is associated with fasting glucose concentrations and dyslipidemia in general population.

e-mail: skackov@bonifarm.hr

P03 – Hematologija i koagulacija

P03-1 (Usmeno priopćenje)

Prikaz slučaja: određivanje krvne slike kod izrazite lipemije

Paradinović K, Milić M, Majetić-Cetina N

Odjel za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Klinička bolnica Osijek, Osijek

Uvod: Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije hemoglobina podložno je utjecaju hipertrigliceridemije u uzorku. Izmjerena vrijednost hemoglobina je netočno previsoka, a također i računski parametri MCH i MCHC.

Cilj: Kako točno odrediti koncentraciju hemoglobina i računске parametre u izrazito lipemičnom uzorku.

Materijali i metode: Uzorak krvne slike izmjeren je na hematološkom brojaču ADVIA 2120 koji određuje hemoglobin dvjema metodama: spektrofotometrijski i mjerenjem CHCM. Zbog velike razlike dobivenih vrijednosti određen je i hemoglobin u plazmi i trigliceridi u serumu.

Rezultati: Spektrofotometrijski hemoglobin iznosio je 158,0 g/L, a računski preko CHCM-a 93,0 g/L. Izmjereni trigliceridi bili su 120,66 mmol/L. Izmjereni hemoglobin u plazmi bio je 89 g/L što je korišteno za računsku korekciju spektrofotometrijskog hemoglobina čija je vrijednost nakon preporučenog načina korekcije iznosila 92,3 g/L.

Zaključak: Metoda računskog određivanja hemoglobina putem CHCM-a potpuno je neovisna o lipemiji.

e-pošta: paradinovic.ksenija@kbo.hr

P03 – Haematology and coagulation

P03-1 (Oral presentation)

Case report: complete blood count in severe lipemic sample

Paradinović K, Milić M, Majetić-Cetina N

Department for clinical laboratory diagnostics, Osijek University Hospital, Osijek, Croatia

Background: Severe lipemia is a known interference that can falsely elevate a hemoglobin result obtained from colorimetric hemoglobin method. When hemoglobin is falsely increased, the MCH and MCHC are also falsely increased.

Aim: Determination and correction of hemoglobin concentration and calculated parameters in severe lipemic sample.

Material and methods: Complete blood count was determined on ADVIA 2120 which determinates hemoglobin by two methods: colorimetric and directly measuring CHCM to calculate cellular hemoglobin. Since the results between these two methods were significant, we determined plasma hemoglobin and triglyceride in serum.

Results: Colorimetric hemoglobin concentration was 158.0 g/L. Cellular hemoglobin was 93.0 g/L. Triglycerides in serum were 120.66 mmol/L. Hemoglobin in plasma was 89.0 g/L which we used in correcting hemoglobin in whole blood. After correction hemoglobin concentration was 92.3 g/L.

Conclusion: Using CHCM to calculate hemoglobin is unaffected by lipemia.

e-mail: paradinovic.ksenija@kbo.hr

P03-2 (Usmeno priopćenje)

Postotak hipokromnih eritrocita kao pokazatelj funkcionalnog manjka željeza kod bolesnika na hemodijalizi

Šimek S, Županić D, Mujagić R, Honović L

Medicinsko biokemijski laboratorij, Opća bolnica Pula, Pula

Uvod: Hipokromni eritrociti osjetljiv su pokazatelj sideropenične eritropoeze i funkcionalne anemije kod bolesnika na hemodijalizi liječenih eritropoetinom. Cilj rada bio je prikazati rezultate hematoloških i biokemijskih parametara dobivenih sistematskim pregledom hemodijaliziranih bolesnika i pronaći njihovu međusobnu povezanost.

Materijali i metode: U istraživanje su uključena 44 bolesnika. Laboratorijska dijagnostika uključivala je određivanje hemoglobina (Hb), postotka hipokromnih eritrocita (%HYPO), retikulocita, željeza, TIBC, UIBC i feritina. Hematološki parametri određeni su na hematološkom analizatoru ADVIA 120 (Bayer, SAD), željezo, TIBC i UIBC na analizatoru Olympus AU400 (Olympus, Japan) i feritin na analizatoru ARCHITECT i2000 SR (Abbott, SAD).

Rezultati: U skladu sa smjernicama za liječenje anemija u bolesnika s kroničnim zatajenjem bubrega u ispitivanoj skupini Hb < 110 g/L nađen je kod 29 (66%) bolesnika, %HYPO > 2,5 kod 13 (29%), %HYPO > 10 kod 2 (4,5%), feritin < 100 ng/mL kod 14 (31,8%) bolesnika. Za procjenu dijagnostičkog značaja %HYPO u otkrivanju funkcionalnog manjka željeza upotrebljena je ROC analiza uz koncentraciju feritina < 100 ng/mL kao kriterij. Izračunata površina ispod krivulje (AUC = 0,72; 95%CI = 0,565-0,845) i pripadajuća optimalna granična vrijednost (%HYPO > 2%) ukazuju na mogući nedostatak željeza uz dijagnostičku osjetljivost i specifičnost koje iznose 64,2% i 76,7%.

Prema Spearmanovoj korelaciji nađena je značajna povezanost između %HYPO i Hb (P = 0,046) i %HYPO i UIBC (P < 0,001).

Zaključak: Dobivene vrijednosti mjerenih parametara pokazuju povezanost %HYPO s Hb i %HYPO s UIBC. Međutim, prema prihvaćenim smjernicama za liječenje anemije nisu dostignute preporučene ciljne vrijednosti za hemoglobin i feritin.

e-pošta: danijela.zupanic@pu.t-com.hr

P03-2 (Oral presentation)

The percentage of hypochromic red blood cells as a marker of functional iron deficiency in hemodialysis patients

Šimek S, Županić D, Mujagić R, Honović L

Laboratory of Medical Biochemistry, Pula General Hospital, Pula, Croatia

Introduction: Hypochromic red blood cells are sensitive marker of sideropenic erythropoiesis and functional anemia in hemodialysis patients treated with erythropoietin. The aim of this study was to show the relationship between the results of some hematological and biochemical parameters obtained from hemodialysis patients on their period checkup.

Materials and methods: The study included 44 patients. Laboratory diagnostics included determination of hemoglobin (Hb), percentage of hypochromic red blood cells (%HYPO), reticulocytes, iron, TIBC, UIBC and ferritin. Hematological parameters were determined on cell counter ADVIA 120 (Bayer, USA), iron, TIBC and UIBC on Olympus AU400 analyzer (Olympus, Japan) and ferritin on ARCHITECT i2000 SR analyzer (Abbott, USA).

Results: In accordance with the guidelines for treating anemia in patients with chronic kidney failure in examined group, Hb < 110 g/L was found in 29 (66%) patients, %HYPO > 2.5 in 13 (29%), %HYPO > 10 in 2 (4.5%), ferritin < 100 ng/mL in 14 (31.8%) patients. For the assessment of diagnostic significance of %HYPO in discovering the functional iron deficiency, ROC analysis is used with cut off ferritin concentration < 100 ng/mL as a criteria. Calculated area under the curve is 0.72 (95% CI = 0.565-0.845) and the corresponding optimal cut off value of %HYPO > 2% indicate a possible iron deficiency with a diagnostic sensitivity and specificity 64.2%, and 76.7%.

According to Spearman correlation a significant relationship between %HYPO and Hb (P = 0.046) and %HYPO and UIBC (P < 0.001) was found.

Conclusion: Measured parameters show a significant connection between %HYPO and Hb and %HYPO and UIBC. However, according to accepted guidelines for treatment of anemia the recommended target values for hemoglobin and ferritin have not been reached.

e-mail: danijela.zupanic@pu.t-com.hr

P03-3 (Usmeno priopćenje)

Tromboelastometrija u trudnica s preeklampsijom

Bernt Živković T, Kralik Oguić S

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar
Zagreb, Zagreb

Uvod: U toku normalne trudnoće dolazi do fizioloških promjena u mehanizmu koagulacije koje često rezultiraju hiperkoagulabilnošću. Smatra se da su mnoge komplikacije u trudnoći povezane s poremećajima zgrušavanja, kao npr. preeklampsija i eklampsija. Prevaga tromboksana (TXA2) nad prostaciklinom (PGI2) uzrokuje hipertenziju, oštećenje bubrega, aktivaciju trombocita i mikrotrombozu. Tromboelastometrija je metoda koja pruža informacije o najvažnijim poremećajima u zgrušavanju vrlo brzo od uzorkovanja u punoj krvi i predstavlja važan doprinos u razumijevanju i praćenju hemostatskih promjena.

Cilj: Svrha ovog rada je dokazati eventualne promjene u tromboelastogramu u trudnica s preeklampsijom u odnosu na zdrave trudne žene.

Ispitanice i metode: U 28 zdrave trudnice (35 do 41 tj. trudnoće) i 34 trudnice s preeklampsijom (35 do 39 tj. trudnoće) učinjen je tromboelastogram (Rotem delta, Pentapharm GmbH).

Određivani su parametri CT - reakcijsko vrijeme, CFT - vrijeme stvaranja stabilnog ugruška, MCF - maksimalna čvrstoća ugruška, alfa kut i postotak redukcije MCF nakon 60 minuta.

Rezultati: Svi parametri dobiveni tromboelastometrijom i u zdravih trudnica i u trudnica sa znakovima preeklampsije ukazuju na hiperkoagulabilnost, ali razlike između te dvije skupine nisu bile statistički značajne.

Zaključak: Smanjena produkcija PGI2 u majčinoj krvi i placentalnoj cirkulaciji smatra se etiološkim faktorom patofizioloških promjena kod preeklampsije što dovodi do vazokonstrikcije i tromboze uteroplacentalnih arterija. TEG je metoda kojom se ne mogu mjeriti te lokalne promjene, ali može biti vrijedan doprinos u praćenju hemostatskih poremećaja.

e-pošta: tajanaberntzivkovic@net.hr

P03-3 (Oral presentation)

Tromboelastometry in pregnant women with preeclampsia

Bernt Živković T, Kralik Oguić S

Clinical Institute for Laboratory Diagnostics, Clinical Zagreb Hospital
Centre, Zagreb, Croatia

Introduction: Pregnancy is considered a hypercoagulable state. There is much interest in the relationship between coagulation status and complications of pregnancy. Increased incidence of thromboembolic phenomena have been reported in pregnant women. Pre-eclampsia and eclampsia may complicate some pregnancies and is often associated with abnormalities of hemostasis. The tromboelastograph (TEG) has been proposed as a useful, inexpensive tool to screen for patients with hypercoagulable state. A TEG measures whole blood coagulation and fibrinolysis.

Aim: The purpose of this study was to document tromboelastografic (TEG) changes in preeclampsia or eclampsia and to compare these results with the same results in health, normal, term pregnant women.

Patients and methods: A TEG was performed in 28 normal, term pregnant women (35-41 weeks of pregnancy) and in 34 preeclamptic women admitted to the delivery (35-39 weeks of pregnancy) using native whole blood (Rotem delta, Pentapharm GmbH). The TEG variables included CT - clotting time, CFT - Clot formation time, MCF - Maximum Clot Firmness, alpha angle and percentage of reduction in MCF at 60 minutes.

Results: TEG parameters for both groups showed that term pregnant women as well as preeclamptic women were in hypercoagulable state, but no significant differences between these two groups were observed.

Conclusion: Although standard laboratory tests are still necessary to detect coagulation abnormalities the TEG is useful as it is compact, easily located within the delivery suite, relatively easy to use and produces initial results very quickly. Preeclampsia is associated with endothelial damage, impaired production of prostacycline and increased deposition of fibrin within the vascular bed. The TEG does not measure these local changes, but can be used to determine the effects on overall clotting.

e-mail: tajanaberntzivkovic@net.hr

P03-4

Osjetljivost analizatora funkcije trombocita PFA-100 na von Willebrandovu bolest

Coen Herak D, Miloš M, Zadro R

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskoga fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: PFA-100 je specifični analizator funkcije trombocita koji mjeri vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (CT) u prisutnosti kolagena i adrenalina (CEPI), te kolagena i ADP-a (CADP). Cilj istraživanja bio je utvrditi osjetljivost PFA-100 na von Willebrandovu bolest (VWB) s obzirom na različite aktivnosti (VWF:RCo) i vrijednosti antigena (VWF:Ag) von Willebrandovog faktora.

Materijali i metode: Ispitanici su svrstani u skupine prema vrijednostima VWF:RCo/VWF:Ag: skupina N (> 50%), skupina 1 (40-50%), skupina 2 (30-39,9%), skupina 3 (20-29,9%) i skupina 4 (< 20%), te su im izmjereni CEPI-CT i CADP-CT.

Rezultati: U skupini s normalnim VWF:RCo (N = 145), dobiveni su rezultati unutar referentnog intervala: CEPI-CT u 82,1%, CADP-CT u 86,2% te za oba testa u 74,5% ispitanika. U skupini s normalnim VWF:Ag (N = 141), dobiveni su rezultati unutar referentnog intervala: CEPI-CT u 74,5%, CADP-CT u 78,0%, te oba testa u 66,7% ispitanika. U skupinama sa sniženim VWF:RCo, dobivene su sljedeće osjetljivosti za CEPI-CT, CADP-CT i kombinaciju oba testa: skupina 1 (N = 15): 60%, 46,7%, 40%; skupina 2 (N = 10): 50%, 60%, 50%; skupina 3 (N = 13): 76,9%, 92,3%, 76,9%. U skupini 4 (N = 18) je dobivena 100% osjetljivost za CEPI-CT, CADP-CT i kombinaciju oba testa. U skupinama sa sniženim VWF:Ag, dobivene su sljedeće osjetljivosti za CEPI-CT, CADP-CT i kombinaciju oba testa: skupina 1 (N = 8): 62,5%, 87,5%, 62,5%; skupina 2 (N = 7): 85,7%, 100%, 85,7%. U skupini 3 (N = 4) i skupini 4 (N = 8) je dobivena 100% osjetljivost za CEPI-CT, CADP-CT i kombinaciju oba testa.

Zaključak: PFA-100 pokazuje visoku osjetljivost na VWB, posebice kod nižih VWF:RCo/VWF:Ag, uz 100% osjetljivost kod ispitanika s vrijednostima < 20%.

e-pošta: desireecoen@yahoo.com

P03-4

Sensitivity of the Platelet Function Analyzer (PFA-100) as a screening test for laboratory diagnosis of von Willebrand disease

Coen Herak D, Miloš M, Zadro R

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of Medicine and Clinical Hospital Center, Zagreb, Croatia

Introduction: Many studies have shown high sensitivity of Platelet Function Analyzer 100 (PFA-100) to von Willebrand disease (VWD).

Methods: We evaluated sensitivity of PFA-100 to different degrees of VWF:RCo/VWF:Ag deficiency, by measuring closure times (CTs) with collagen/epinephrine (CEPI) and collagen/ADP (CADP) in groups with different VWF:RCo/VWF:Ag values: group with normal values (> 50%), group 1 (40-50%), group 2 (30-39.9%), group 3 (20-29.9%) and group 4 (< 20%).

Results: In the group with normal VWF:RCo values (N = 145), normal CTs were obtained in 82.1% cases with CEPI, 86.2% with CADP, and 74.5% cases with both tests. In the group with normal VWF:Ag values (N = 141), normal CTs were obtained in 74.5% cases with CEPI, 78.0% with CADP and 66.7% cases with both tests. In the groups with decreased VWF:RCo values, the calculated sensitivities for CEPI-CT, CADP-CT and both tests, were as follows: group 1 (N = 15): 60%, 46.7% and 40%, respectively; group 2 (N = 10): 50%, 60% and 50%, respectively; group 3 (N = 13): 76.9%, 92.3% and 76.9%, respectively; group 4 (N = 18): 100% for CEPI-CT, CADP-CT and both. In groups with decreased VWF:Ag values, the calculated sensitivities for CEPI-CT, CADP-CT and both tests, were as follows: group 1 (N = 8): 62.5%, 87.5% and 62.5%, respectively; group 2 (N = 7): 85.7%, 100% and 85.7%, respectively; group 3 (N = 4) and 4 (N = 8): 100 for CEPI-CT, CADP-CT and both.

Conclusion: PFA-100 as a screening test for VWD shows higher sensitivity towards lower VWF:RCo/VWF:Ag values, with 100% sensitivity for patients with values below 20%.

e-mail: desireecoen@yahoo.com

P03-5

Usporedba sniženog broja trombocita na različitim hematološkim analizatorima

Pauković Sekulić B, Bošnjak N, Sapunar A, Tandara L, Salamunić I

Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Split, Split

Uvod: Iako hematološki analizatori precizno i točno određuju broj trombocita, ne mogu u potpunosti razlikovati trombocite od fragmenata blasta, eritrocita i precipitata krioglobulina. Cilj je bio ispitati odnos broja trombocita i utemeljenost vlastitih iskustvenih spoznaja o usporedivosti rezultata s različitim analizatorima.

Materijali i metode: Broj trombocita usporedno je određen optičkom metodom na analizatorima Advia 120 (Bayer, USA), Sysmex XE-2100 (Toa, Kobe, Japan), Cell-Dyn Sapphire (Abbott Diagnostics, USA) i impedancijom na analizatoru Sysmex XE-2100. Ispitano je 30 uzoraka s normalnim brojem trombocita, 50 uzoraka s trombocitima $21-100 \times 10^9/L$ i 20 uzoraka ispod $20 \times 10^9/L$ trombocita prema vrijednostima s analizatora Advia 120.

Rezultati: U zdravih ispitanika i bolesnika s trombocitima $21-100 \times 10^9/L$ korelacijski koeficijenti (r) i koeficijenti determinacije (R^2) između analizatora su bili $r = 0,931$; $R^2 = 0,866$. U bolesnika s trombocitima ispod $20 \times 10^9/L$ koeficijenti su bili: Advia-Sysmeximp $r = 0,781$; $R^2 = 0,611$; Advia-Sysmexopt $r = 0,616$; $R^2 = 0,380$; Advia-Sapphireopt $r = 0,756$; $R^2 = 0,572$. Uvjeti Passing-Bablok regresije zadovoljeni su kod zdravih ispitanika, a nisu kod bolesnika s trombocitima $21-100 \times 10^9/L$ između: Advia-Sysmexopt (95% CI, $b = 0,850-0,986$) i Advia-Sapphireopt (95% CI, $a = -10,833-(-2,134)$) te kod bolesnika s trombocitima ispod $20 \times 10^9/L$ između Advia-Sapphireopt (95% CI, $a = -8,167-(-0,875)$). 95 % granice podudaranja srednjih razlika iz sažetog Bland-Altmanovog dijagrama bile su za trombocite ispod $20 \times 10^9/L$ između: Advia-Sysmeximp -8,829 do 4,528; Advia-Sysmexopt -8,341 do 9,441 i Advia-Sapphireopt -10,998 do 1,598.

Rezultati: Ispitivanje je pokazalo klinički značajno neslaganje niskih rezultata broja trombocita između analizatora. U svakodnevnom radu preporuča se ove bolesnike pratiti na istom analizatoru ili verificirati rezultate mikroskopski ili protočnom citometrijom.

e-pošta: branka.paukovic-sekulic@st.htnet.hr

P03-5

Comparison of decreased platelet counts on different haematology analyzers

Pauković Sekulić B, Bošnjak N, Sapunar A, Tandara L, Salamunić I

Department of Laboratory Diagnostics, Split University Hospital Centre, Split, Croatia

Introduction: Although haematology analyzers provide the high precision and accuracy in determining the number of platelets, they cannot completely distinguish the platelets from other cell fragments. The aim of the study was to examine the correlation of platelet counts and own empiric cognitions about the comparability of results from different analyzers.

Materials and methods: The platelet counts were determined parallel by optical method on analyzers Advia 120 (Bayer, USA), Sysmex XE-2100 (Toa, Kobe, Japan), Cell-Dyn Sapphire (Abbott Diagnostics, USA) and by impedance method on analyzer Sysmex XE-2100. In the study were tested 30 normal subjects, 50 patients with the platelets $21-100 \times 10^9/L$ and 20 patients with the platelets below $20 \times 10^9/L$ toward values obtained on Advia 120. In normal subjects and patients with platelets $21-100 \times 10^9/L$ the correlation coefficient (r) and coefficient of determination (R^2) between analyzers were $r = 0,931$; $R^2 = 0,866$. In patients with platelets below $20 \times 10^9/L$ coefficients between analyzers were: Advia-Sysmeximp $r = 0,781$; $R^2 = 0,611$; Advia-Sysmexopt $r = 0,616$; $R^2 = 0,380$; Advia-Sapphireopt $r = 0,756$; $R^2 = 0,572$. Passing-Bablok regression were satisfied for the normal subjects but it were not satisfied for the patients with platelets $21-100 \times 10^9/L$ between: Advia-Sysmexopt (95% CI, $b = 0,850$ to $0,986$); Advia-Sapphireopt (95% CI, $a = -10,833$ to $-2,134$) and in patients with platelets below $20 \times 10^9/L$ between Advia-Sapphireopt (95% CI, $a = -8,167$ to $-0,875$). 95 % limits of agreements of the mean differences obtained from the summarised Bland-Altman diagram were for platelets below $20 \times 10^9/L$ between: Advia-Sysmeximp -8,829 to 4,528; Advia Sysmexopt -8,341 to 9,441; Advia-Sapphireopt -10,998 to 1,598.

Results: The study showed the clinical significant disagreement of results between analyzers in patients with decreased platelet counts. In the daily work, it is recommend observe these patients on the same analyzer, or making the additional verification of result by microscope or flow cytometry.

e-mail: branka.paukovic-sekulic@st.htnet.hr

P03-6

Analitička evaluacija testa Innovance D-DIMER

Coen Herak D, Miloš M, Zadro R

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskoga fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: Sve veći broj zahtjeva za kvantitativnim određivanjem D-dimera u posljednjih je nekoliko godina rezultirao razvojem velikog broja novih, potpuno automatiziranih testova za kvantitativno određivanje D-dimera.

Materijali i metode: Izvršena je analitička evaluacija imunoturbidimetrijskog testa s česticama lateksa za kvantitativno određivanje D-dimera Innovance D-DIMER na koagulometru Behring Coagulation System (Siemens Medical Solutions Diagnostics).

Rezultati: Određivanjem nepreciznosti u seriji u uzorcima plazmi s niskim, graničnim, lagano i izrazito povišenim vrijednostima D-dimera dobiveni su koeficijenti varijacije (CV) od 2,1% do 5,5%, dok su vrijednosti CV-a za kontrolne uzorke s niskom i izrazito povišenom vrijednosti D-dimera iznosili od 5,5% do 8,4%. Utvrđena je dobra linearnost metode u mjernom području od 0,17 do 5,45 mg/L FEU, te donja granica analitičke osjetljivosti od 0,099 mg/L FEU. Za određivanje referentnog intervala uporabljeno je 40 uzoraka plazmi zdravih osoba, a dobivena gornja granica iznosila je 0,495 mg/L FEU. Usporedba dobivenih rezultata u 419 svježih uzoraka plazmi izvršena je s rezultatima dobivenim uporabom testa Vidas D-DIMER Exclusion na instrumentu mini Vidas (bioMérieux). Iako je linearnom regresijskom analizom prema Passingu i Babloku dobivena visoka korelacija ($y = 1,370x - 0,108$, $r = 0,952$, $P < 0,001$), analiza prema Blandu i Altmanu pokazala je lagano više vrijednosti s testom Innovance D-DIMER koje su bile izraženije s porastom vrijednosti. U klasifikaciji bolesnika u odnosu na graničnu vrijednost dobiveno je vrlo dobro slaganje rezultata između testova Innovance D-DIMER i Vidas D-Dimer Exclusion (kappa-koeficijent = 0,860; 95% interval pouzdanosti, 0,811-0,908).

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja ukazuju da test Innovance D-DIMER ispunjava sve analitičke zahtjeve za rutinsku primjenu.

e-pošta: desireecoen@yahoo.com

P03-6

Evaluation of the Innovance D-DIMER analytical performance

Coen Herak D, Miloš M, Zadro R

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of Medicine and University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Introduction: A widespread use of D-dimer in recent years has led to the development of a number of new fully automated quantitative D-dimer assays.

Methods: We evaluated the analytical performance of the recently developed particle-enhanced immunoturbidimetric assay Innovance D-DIMER on the Behring Coagulation System analyzer (Siemens Medical Solutions Diagnostics).

Results: The within-run coefficients of variation (CVs) for samples with low, borderline, slightly elevated and extremely elevated D-dimer ranged from 2.1% to 5.5%, whereas the between-run CVs for control samples with low and extremely elevated D-dimer ranged from 5.5% to 8.4%. The assay method exhibited very good linearity in the working range between 0.17 and 5.45 mg/L FEU with the analytical detection limit of 0.099 mg/L FEU. The upper reference value determined in 40 plasma samples from apparently healthy volunteers was 0.495 mg/L FEU. For the method comparison study, the results obtained in 419 fresh plasma samples were compared with the results obtained with the Vidas D-DIMER Exclusion on the mini Vidas (bioMérieux). Linear regression analysis according to Passing and Bablok demonstrated a highly significant correlation ($y = 1.370x - 0.108$, $r = 0.952$, $P < 0.001$). Bland and Altman difference plots demonstrated slightly higher results obtained with Innovance D-DIMER that were more pronounced with increasing values. Very good agreement between Innovance D-DIMER and Vidas D-Dimer Exclusion was observed in classifying patient results as above or below the cut-off value (kappa coefficient = 0.860; 95% CI, 0.811-0.908).

Conclusions: This study demonstrates that Innovance D-DIMER fulfills all analytical requirements for implementation in daily routine.

e-mail: desireecoen@yahoo.com

P03-7

Procjena dijagnostičkog značaja hematoloških parametara u otkrivanju nedostatka vitamina B₁₂ ili folata

Šimek S, Županić D, Pirija M, Percan M, Mujagić R, Honović L

Medicinsko biokemijski laboratorij, Opća bolnica Pula, Pula

Uvod: Megaloblastična anemija je makrocitna anemija (MCV > 97 fL) koju karakterizira poremećaj sazrijevanja jezgre u odnosu na citoplazmu, a najčešće je razlog nedostatak vitamina B₁₂ ili folata.

Cilj: Cilj ovog rada je ispitati povezanost hematoloških parametara s nedostatkom vitamina B₁₂ ili folata u skupini bolesnika s MCV > 97 fL.

Materijali i metode: U istraživanje je uključeno 69 bolesnika (28 žena i 41 muškarac) s MCV > 97 fL, srednje dobi izražene medijanom (73 godine). Uz MCV određeni su slijedeći parametri: koncentracija hemoglobina, postotak makrocita, indeks segmenata, postotak hipersegmentiranih granulocita (%HS) te koncentracija vitamina B₁₂ i folata. Hematološki parametri određeni su na hematološkom analizatoru ADVIA 120 (Bayer, SAD), %HS i indeks segmenata određen je pregledom razmaza periferne krvi svjetlosnim mikroskopom BH 2 (Olympus, Japan), a koncentracija vitamina B₁₂ i folata određena je na analizatoru ARCHITECT i2000 SR (Abbott, SAD), CMIA imunokemijskom metodom.

Rezultati: Temeljni kriterij za provedenu ROC analizu bila je dijagnostička primjena hematoloških parametara u otkrivanju nedostatka vitamina B₁₂ ili folata. Pri tome je analiza pokazala povezanost između nedostatka vitamina B₁₂ i %HS. Za %HS izračunata površina ispod krivulje (AUC) je 0,656, a interval pouzdanosti (95% CI) iznosi 0,529 do 0,769, optimalna granična vrijednost (cut off) iznosi 7% te vrijednost za dijagnostičku osjetljivost i specifičnost 77,2% i 56,8%. Pri otkrivanju nedostatka folata niti jedan od ispitivanih parametara nije pokazao dijagnostički značaj.

Zaključak: Prema rezultatima ovog rada zaključujemo da je postotak hipersegmentiranih granulocita osjetljiviji pokazatelj deficita B₁₂ u odnosu na druge hematološke parametre.

e-pošta: danijela.zupanic@pu.t-com.hr

P03-7

Assessment of diagnostic significance of hematological parameters in discovering the deficiency of vitamin B₁₂ or folate

Šimek S, Županić D, Pirija M, Percan M, Mujagić R, Honović L

Laboratory of Medical Biochemistry, Pula General Hospital, Pula, Croatia

Introduction: Megaloblastic anemia is macrocytic anemia (MCV > 97 fL) characterized by nuclear maturation defect and. The deficiency of vitamin B₁₂ or folate is often the reason for that. The aim of this study is to show the relationship between the hematological parameters and the deficiency of vitamin B₁₂ or folate in the group of patients with MCV > 97 fL.

Materials and methods: The study included 69 patients (28 women and 41 men) with MCV > 97 fL and medium age 73 years. Following parameters were measured: hemoglobin concentration, percentage of macrocytes, segment index, percentage of hypersegmented neutrophils (%HS) and the concentration of vitamin B₁₂ and folate. Hematological parameters were determined on cell counter ADVIA 120 (Bayer, USA), %HS and segment index were determined on peripheral blood smear in bright field microscopy (BH-2, Olympus, Japan), and the concentration of vitamin B₁₂ and folate were determined on the analyzer ARCHITECT i2000 SR (Abbott, USA), with CMIA immunochemical method.

Results: The basic criteria for ROC analysis was a diagnostic application of hematological parameters in discovering a deficiency of vitamin B₁₂ or folate. The analysis showed a connection between the deficiency of vitamin B₁₂ and %HS. Calculated area under the curve (AUC) for %HS was 0.656, the confidence interval (95% CI) was 0.529 to 0.769, optimal cut off value was 7% and the value of diagnostic sensitivity and specificity 77.2% and 56.8%. None of the tested parameters showed diagnostic significance in discovering the deficiency of folate.

Conclusion: With the results of this study we can conclude that the percentage of hypersegmented neutrophils is a sensitive indicator of B₁₂ deficiency in relation to other hematologic parameters.

e-mail: danijela.zupanic@pu.t-com.hr

P03-8

Monoklonski IgM s aktivnošću lupus antikoagulant – utjecaj na koagulacijske testove

Miloš M, Coen Herak D, Matišić D, Zadro R

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskoga fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: Prisutnost monoklonskog imunoglobulina može prouzročiti poremećaj u primarnoj ili sekundarnoj hemostazi. U ovom su radu prikazana 3 bolesnika s monoklonskim proteinom klase IgM, s patološkim vrijednostima PV-a i APTV-a, bez kliničkih znakova krvarenja.

Materijali i metode: Za sve bolesnike izrađeni su rutinski koagulacijski testovi: PV s rekombinantnim tromboplastinom (Innovin) i ljudskim placentalnim tromboplastinom (Thromborel S); APTV (Actin FS); aktivnost faktora zgrušavanja s istim reagensima za PV i APTV (Siemens Medical Solutions Diagnostics). Prisutnost lupus antikoagulant (LA) je ispitivana prema preporukama Pododbora za lupus antikoagulant i antitijela ovisna o fosfolipidima Međunarodnog društva za trombozu i hemostazu (SSC ISTH). Antitijela prema protrombinu i beta-2-glikoproteinu I određena su enzim-imunotestom (AESCU, Diagnostics). Imunofiksacija seruma napravljena je na Sebia Hydrasys.

Rezultati: Kod sva tri bolesnika dobivene su izrazito patološke vrijednosti PV-a i APTV-a koje se nisu korigirale nakon miješanja s normalnom plazmom. Izmjerene aktivnosti faktora ukazivale su na inhibiciju gotovo svih faktora zgrušavanja s porastom aktivnosti nakon razrjeđivanja; u uzorcima sva 3 bolesnika dokazana je prisutnost LA. Ponovljenim mjerenjem PV-a s Thromborelom S dobiveni su rezultati unutar referentnog intervala. Enzim-imunotestom izmjeren je visoki titar antitijela prema protrombinu i beta-2-glikoproteinu I. Nakon slučajnog nalaza monoklonskog IgM kod bolesnika 1 (43,0 g/L), imunofiksacijom seruma kod druga dva bolesnika također je potvrđen monoklonski IgM (28,8 g/L i 6,97 g/L).

Zaključak: Kombinacija dobivenih rezultata upućuje na prisutnost monoklonskog IgM koji ima snažnu aktivnost LA i specifičnost prema protrombinu i beta-2-glikoproteinu I.

e-pošta: marijamilos1@yahoo.com

P03-8

Monoclonal IgM paraprotein with lupus anticoagulant activity – influence on coagulation testing

Miloš M, Coen Herak D, Matišić D, Zadro R

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of
Medicine and Clinical Hospital Center, Zagreb, Croatia

Introduction: The presence of monoclonal immunoglobulin can induce disturbances of either primary or secondary hemostasis. Hereby we report 3 cases with monoclonal IgM paraprotein and prolonged screening coagulation tests despite absence of bleeding manifestations.

Methods: Routine coagulation tests were performed for all patients: PT with recombinant thromboplastin Innovin and human placental thromboplastin Thromborel S; APTT with Actin FS; one-stage factor assays with the same PT- and APTT-reagents (Siemens Medical Solutions Diagnostics). The presence of lupus anticoagulant (LA) was tested according to the guidelines proposed by the SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant and Phospholipid-Dependent Antibodies of the ISTH. In addition, antibodies against prothrombin and beta-2-glycoprotein I were determined with enzyme immunoassay (AESCU, Diagnostics GmbH). Immunofixation of patients' sera was performed on Sebia Hydrasys.

Results: Prolonged PT with Innovin and APTT were obtained, without corrections after mixing studies. In factor assays, inhibition of almost all factor activities was detected, with rise in factor activities after multiple dilutions of plasma samples. Sequentially, the presence of LA was confirmed. Surprisingly, PT testing with Thromborel S resulted in normal PT-results, suggesting the possible presence of antibodies against prothrombin. This was confirmed by positive finding of antibodies against both prothrombin and beta-2-glycoprotein I. Based on accidental detection of monoclonal IgM in patient 1 (43.0 g/L), monoclonal IgM was also confirmed in other 2 patients (28.8 g/L and 6.97 g/L, respectively).

Conclusions: This combination of findings could be assigned to the presence of monoclonal IgM paraprotein with both antiprothrombin and anti-beta2-glycoprotein I specificity and strong LA activity.

e-mail: marijamilos1@yahoo.com

P03-9

Umbilikalna krv – važnost hematološke analize u procjeni prikladnosti uzorka za pohranu

Kutnjak V¹, Rogić D², Kajinić D³, Gojčeta K⁴, Golubić-Čepulić B⁴

¹Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

²Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

³Opća bolnica Slavonska Požega, Slavonska Požega

⁴Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: Transplantacija krvotvornih matičnih stanica spada u standardne postupke liječenja malignih hematoloških i nekih drugih bolesti. U posljednjem desetljeću se u tu svrhu sve više koriste i matične stanice iz umbilikalne krvi srodnog ili nesrodnog davatelja. Cilj rada bio je ispitati točnost mjerenja broja eritroblasta u umbilikalnoj krvi na hematološkom analizatoru, te usporediti raspoložive metode za određivanje koncentracije krvotvornih matičnih stanica.

Matijali i metode: Analizirano je 223 uzorka umbilikalne krvi uzetih na standardni način pri porodu. Napravljena je usporedba rezultata broja eritroblasta s dvaju hematoloških analizatora (Sysmex XE-2100 i Abbott CELL DYN Sapphire), s obzirom da ih umbilikalna krv redovito sadrži u manjem ili većem broju. Rezultati s analizatora uspoređeni su s referentnom manuelnom mikroskopskom metodom. Također je provjerena mogućnost mjerenja krvotvornih matičnih stanica na Sysmex XE-2100 hematološkom analizatoru usporedbom sa brojem CD 34 pozitivnih stanica izmjerenih protočnom citometrijom.

Rezultati i zaključci: Točnost brojanja leukocita od presudne je važnosti za uzorke umbilikalne krvi koji se pohranjuju u banku, s obzirom da se iz ukupnog broja leukocita dobiva apsolutni broj CD34 pozitivnih stanica po kojem se procjenjuje kvaliteta uzorka za moguću transplantaciju. Usporedbom s ručnim brojenjem eritroblasta, ustanovili smo veću točnost Sysmex XE 2100 analizatora ($r = 0,98$) naspram Cell Dyn Sapphira ($r = 0,77$), čije korištenje ne preporučujemo za uzorke umbilikalne krvi. Hematološki analizator Sysmex XE2100 još uvijek nema dovoljnu osjetljivost i reproducibilnost za točnu procjenu broja krvotvornih matičnih stanica u umbilikalnoj krvi. Korelacija između dvije metode (hematološki analizator i referentna protočna citometrija) je vrlo slaba ($r = 0,31$), te se broj matičnih stanica i dalje pouzdano može odrediti jedino protočnom citometrijom.

e-pošta: dunjarogic@hotmail.com

P03-9

Umbilical cord blood – the importance of hematology analyzer data in estimating the appropriateness of the unit for long term storage

Kutnjak V¹, Rogić D², Kajinić D³, Gojčeta K⁴, Golubić-Čepulić B⁴

¹Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

²Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of Medicine and Clinical Hospital Center, Zagreb, Croatia

³General hospital Slavonska Požega, Slavonska Požega, Croatia

⁴Zagreb University Hospital, Zagreb, Croatia

Uvod: Allogenic or autologous hematopoietic stem cells transplantation is a standard therapy procedure for hematologic malignancies and some other disorders. Recently, umbilical cord blood (UCB) has been increasingly used as an alternative stem cells source. The aim of this study was to assess the accuracy of hematologic analyzers for UCB analysis, and to compare the available methods for hematopoietic progenitor cells number determination.

Materials and methods: 223 samples of UCB were analyzed by flow cytometry and two hematologic analyzers (Sysmex XE-2100 and Abbott Cell Dyn Sapphire). In this study we investigated the possibility of stem cells detection and numbering by hematology analyzer instead of flow cytometry. We also compared hematological analyzers in their ability to detect eritroblasts, which are always present in cord blood and must be detected accurately to avoid falsely elevated number of leukocytes. This is crucial for the accurate feasibility assessment of each unit stored for possible use in stem cell transplantation.

Results and conclusions: The results of our study show that for hematopoietic stem cells detection, the correlation of two methods (hematologic analyzer and flow cytometry) is very low ($r = 0.31$) and not significant, probably due to the low number of stem cells in UCB. Flow cytometry remains the only recommended method for hematopoietic stem cells detection in cord blood. Leukocyte count accuracy in UCB – one of the hematologic analyzers (Abbott Cell Dyn Sapphire) performed considerably worse than the other (Sysmex XE 2100) with respect to the ability to detect erythroblasts, when compared to the reference manual method (respective correlation coefficients 0.77 vs. 0.98).

e-mail: dunjarogic@hotmail.com

P04 – Bubrežne bolesti

P04-1

Koncentracije humanog fetuina-A kod bolesnika na hemodijalizi

Đerek L, Unić A, Juriček J, Marijančević D, Romić Ž

Zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinička bolnica Dubrava, Zagreb

Uvod: Metastatske kalcifikacije su jedna od čestih komplikacija kod bolesnika na hemodijalizi. Humani fetuin-A (engl. *alfa2-Heremans-Schmid glikoprotein*; AHS) je cirkulirajući kalcij-regulatorni glikoprotein koji inhibira nastajanje kalcifikacija te je zbog toga potencijalni biljeg njihovog nastanka. Cilj ispitivanja bio je usporediti koncentracije fetuina-A kod bolesnika na hemodijalizi s kontrolnom skupinom, te unutar hemodijalizirane skupine ovisno o duljini trajanja liječenja postupkom hemodijalize.

Materijali i metode: U studiju su uključena 92 ispitanika: skupina hemodijaliziranih bolesnika (N = 61) podjeljenih na dvije podskupine (N1 i N2) ovisno o duljini liječenja (N1 = 34: liječenje < 5 godina; N2 = 27: liječenje 5 i više godina). Kontrolnu skupinu (N = 31) sačinjavali su zdravi ispitanici. Fetuin-A određen je metodom ELISA (BioVendor Laboratory Medicine, Inc.). Podaci su statistički testirani jednosmjernom analizom varijance (ANOVA).

Rezultat: Koncentracije fetuina-A u hemodijaliziranoj skupini bile su $0,26 \pm 0,069$ g/L; u N1 skupini $0,25 \pm 0,071$ g/L; u N2 skupini $0,26 \pm 0,0046$ g/L te u kontrolnoj skupini $0,32 \pm 0,057$ g/L. Jednosmjerna analiza varijance pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne i skupine na hemodijalizi ($P = 0,001$). *Post hoc* analiza nije pokazala statistički značajnu razliku između podskupina ovisno o duljini trajanja hemodijalize.

Zaključak: Ova studija je pokazala da su koncentracije fetuina-A snižene u hemodijaliziranoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu, što objašnjava veću podložnost stvaranja kalcifikacija kod bolesnika na hemodijalizi. S obzirom da nije zabilježena statistički značajna razlika koncentracije fetuina-A u ovisnosti o trajanju hemodijalize, trebala bi se dodatno ispitati povezanost fetuina-A, prisustva kalcifikacija te klasičnih biljega nastanka kalcifikacija.

e-pošta: ldjerek@kbd.hr

P04 – Nephrological diseases

P04-1

Concentrations of human fetuin-A in hemodialysed patients

Đerek L, Unić A, Juriček J, Marijančević D, Romić Ž

Department for Laboratory Diagnostics, Dubrava University hospital, Zagreb, Croatia

Background: Metastatic calcifications are one of the complications in hemodialysed patients. Human fetuin-A (alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein; AHS) is a circulating inhibitor of calcification, and a potential predictor of their development. The aim of the study was to compare the concentrations of fetuin-A between hemodialysed patients and control group, and also between subgroups in hemodialysed patients depending on the duration of treatment.

Materials and methods: Our study included 92 participants; group of hemodialysed patients (N = 61) divided into subgroups depending on the duration of treatment (N1 = 34: treatment < 5 years; N2 = 27: treatment 5 years and more). Healthy participants were included in the control group (N = 31). Concentrations of fetuin-A were determined by ELISA. Statistical analysis was performed by univariate analysis of variance.

Results: Concentration of fetuin-A was 0.26 ± 0.069 g/L in the hemodialysed group as a whole; 0.25 ± 0.071 g/L in the N1 group; 0.26 ± 0.0046 g/L in the N2 group and 0.32 ± 0.057 g/L in the control group. Fetuin-A was significantly lower in hemodialysed group as a whole than in the control group ($P = 0.001$). Post-hoc analysis did not show significant difference between fetuin-A depending on the duration of the treatment.

Conclusion: Our study showed that fetuin-A was decreased in the hemodialysed group in comparison to the control group and that explains the greater predisposition for the development of calcifications. Since there was no significant difference between the concentration of fetuin-A in subgroups depending on the duration of the treatment, the connection between fetuin-A, the presence of the calcifications, and classical markers of calcification development should be further investigated.

e-mail: ldjerek@kbd.hr

P05 – Bolesti jetre i gastrointestinalnog trakta

P05-1

Povezanost između aktivnosti serumske Cu/Zn-superoksid-dismutaze te pokazatelja statusa željeza i bakra u bolestima jetre

Vrkić N¹, Mujagić R², Laškaj R³, Topić E¹, Honović L², Jurasović J⁴

¹Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

²Medicinsko-biokemijski laboratorij, Opća bolnica Pula, Pula

³Medicinsko-biokemijski laboratorij, Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb

⁴Jedinica za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

Uvod: Upalna stanja mogu pridonijeti narušavanju statusa bakra, cinka i željeza. Nadalje, aktivnost izvanstanične Cu/Zn-superoksid-dismutaze (SOD) u krvnoj plazmi u izravnoj je povezanosti sa statusom brojnih esencijalnih mikroelemenata poput bakra i cinka. Cilj ovog istraživanja bila je procjena povezanosti između aktivnosti SOD te koncentracije bakra, cinka i željeza u upalnim bolestima jetre.

Materijali i metode: U istraživanje je uključeno ukupno 33 bolesnika s bolešću jetre. Uz uporabu rutinskih analitičkih metoda u uzorcima su određivane koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP), ukupnog/slobodnog bakra (Cu/Cu_{sl}), cinka (Zn), ceruloplazmina (CPm) te aktivnosti ceruloplazmina (CPa) i SOD; te biokemijski pokazatelji statusa željeza, primjerice, koncentracija željeza (Fe), ne-transferinskog željeza (NTFe) i transferina (Tf).

Rezultati: U skupini od 24 ispitanika nađene su značajne korelacije između logaritamski preinačenog CRP-a i koncentracijskog omjera Cu/Zn ($r_p = 0,740$; $P < 0,001$), odnosno Cu_{sl}/Zn ($r_p = 0,644$; $P < 0,001$), te inverzna korelacija između CRP-a i korijenskog preinačenog NTFe ($r_p = -0,421$; $P = 0,036$). Nadalje, u proširenoj skupini ispitanika ($N = 33$) nađene su značajne pozitivne korelacije SOD s NTFe ($r_p = 0,640$; $P < 0,001$), CPm ($r_p = 0,394$; $P = 0,023$), CPa ($r_p = 0,375$; $P = 0,032$), te sa Cu ($r_p = 0,366$; $P = 0,036$).

Zaključak: Znakovito je da je aktivnost SOD pozitivno korelirala s ne-transferinskim željezom, ali nije nađena korelacija između SOD i ukupnog serumske željeza u jetrenih bolesnika. Povišena aktivnost SOD udružena sa povišenom koncentracijom ne-transferinskog željeza u jetrenim bolestima može imati prooksidacijsko djelovanje s obzirom na dodatno stvaranje vodikovog peroksida putem reakcije dismutacije uz popratno stvaranje hidroksilnog radikala putem Fentonove reakcije. Ovi preliminarni rezultati upućuju da istodobni porast SOD i NTFe može biti značajan čimbenik u pogoršanju jetrene bolesti.

e-pošta: renat.mujagic@pu.t-com.hr

P05 – Liver and gastrointestinal diseases

P05-1

Association of Cu/Zn-superoxide dismutase activity in serum with iron and copper status in liver diseases

Vrkić N¹, Mujagić R², Laškaj R³, Topić E¹, Honović L², Jurasović J⁴

¹University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

²Medical Biochemistry Laboratory, Pula General Hospital, Pula, Croatia

³Medical-biochemistry laboratory, University Hospital for Infectious Diseases Dr. Fran Mihaljević, Zagreb, Croatia

⁴Analytical Toxicology and Mineral Metabolism Unit, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatia

Background: Status of iron, copper and zinc could be adversely affected by inflammation. Furthermore, extracellular Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) in the blood plasma is directly associated with the status of numerous essential trace elements such as copper and zinc. The aim of this study was to evaluate the association between SOD and copper, zinc and iron status in inflammatory liver diseases.

Materials and methods: A total of 33 patients with inflammatory liver disease have been included in the study. C-reactive protein, total/free copper (Cu/fCu), zinc (Zn), ceruloplasmin (CPm) concentration, ceruloplasmin activity (CPa) and SOD activity, and finally biochemical indicators of iron status such as total iron (Fe), non-transferin bound iron (NTBI) and transferrin (Tf) have been analyzed in serum by routine analytical methods.

Results: There were significant positive correlations between logarithmically transformed CRP and ratios Cu/Zn ($r_p = 0.740$, $P < 0.001$) and fCu/Zn ($r_p = 0.644$, $P < 0.001$); and inverse correlation between CRP and square root transformed NTBI ($r_p = -0.421$, $P = 0.036$) in the examined group ($N = 24$). Furthermore, there were significant positive correlations of SOD with NTBI ($r_p = 0.640$, $P < 0.001$), CPm ($r_p = 0.394$, $P = 0.023$), CPa ($r_p = 0.375$, $P = 0.032$), and with Cu ($r_p = 0.366$, $P = 0.036$) in the expanded group of patients ($N = 33$).

Conclusion: Indicatively, there was a significant correlation between SOD and non-transferrin iron, however, there was no correlation between SOD and total serum iron in liver disease patients. High SOD activity accompanied with high non-transferrin iron concentration in liver diseases could provoke prooxidative effects depending on generation of additional hydrogen peroxide by dismutation reaction and subsequently hydroxyl radical generation by Fenton chemistry. These preliminary results suggest that simultaneously increase of SOD and NTBI could be an important trigger for liver disease progression.

e-mail: renat.mujagic@pu.t-com.hr

P05-2

Prognostička vrijednost IL-6, IL-18 i sTNFr u ranoj fazi akutnog pankreatitisa

Fišić E¹, Bilić-Zulle L^{1,2}, Šupak Smolčić V¹

¹Zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka

²Katedra za medicinsku informatiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

Uvod: Rana procjena težine akutnog pankreatitisa (AP) od ključnog je značaja za bolesnike koji razvijaju teški oblik bolesti povezan sa sistemskim komplikacijama. Prognostički bodovni sustavi koji se u tu svrhu primjenjuju u praksi tek su djelomično pogodni za procjenu težine bolesti. Cilj rada je utvrditi prognostičku vrijednost serumске koncentracije interleukina-6 (IL-6), interleukina-18 (IL-18) i topivog receptora čimbenika nekroze tumora (sTNFr) u ranoj fazi AP a za predviđanje razvoja komplikacija.

Ispitanici i metode: Koncentracije interleukina izmjerili smo u serumu 150 bolesnika, oboljelih od AP (medijan i raspon dobi 63 (20-91) godina; 47% muškaraca), enzimimunometrijskom metodom (ELISA). Za procjenu težine bolesti izračunali smo APACHE II i Ranson prognostičke bodovne sustave. Sistemske komplikacije razvilo je 19% bolesnika.

Rezultati: Prosječne vrijednosti (medijan) interleukina u serumu bolesnika s komplikacijama i u onih bez bile su: IL-6 = 104 vs. 20 pg/mL ($P = 0,001$), IL-18 = 230 vs. 202 pg/mL ($P = 0,411$) i sTNFr = 2220 vs. 1520 pg/mL ($P = 0,004$). Značajnima su IL-6 i sTNFr te je za njih ROC analizom izračunata površina ispod krivulje (AUC) na prikazu osjetljivosti i specifičnosti za razlikovanje bolesnika s i bez komplikacija. Za IL-6 AUC = 0,71 s graničnom vrijednošću 37,9 pg/ml, a za sTNFr AUC = 0,69 s graničnom vrijednošću 1552 pg/ml. Istovremeno, za prognostički bodovni sustav APACHE AUC = 0,63 i za Ranson AUC = 0,75 s graničnim vrijednostima 9 i 4.

Zaključak: Rezultati pokazuju kako je među ispitivanim serumskim pokazateljima IL-6 najbolji čimbenik za ranu procjenu težine bolesti, za njim slijedi sTNFr, dok IL-18 nema značaj u procjeni razvoja komplikacija. Od prognostičkih bodovnih sustava Ranson ima veću osjetljivost i specifičnost od APACHE II.

e-pošta: elizabeta.fisic@ri.t-com.hr

P05-2

Prognostic values of IL-6, IL-18 and sTNFr in early assessment of acute pancreatitis

Fišić E¹, Bilić-Zulle L^{1,2}, Šupak Smolčić V¹

¹Department of laboratory diagnostics, Rijeka Clinical Hospital Centre, Croatia

²Department of Medical Informatics, Rijeka University School of Medicine, Rijeka, Croatia

Background: Early assessment of severity in acute pancreatitis (AP) is very important for the patients who are at risk for development of systemic complications. Generally used prognostic scoring systems are only of moderate value for disease severity assessment. The aim of the study was to evaluate interleukine-6 (IL-6), interleukine-18 (IL-18) and soluble tumor necrosis factor-receptor (sTNFr) for early assessment of disease severity.

Participants and methods: Cytokines were analyzed by ELISA method from serum taken routinely from 150 patients (median and range of age 63 (20-91) years; 47% males) immediately after hospital admission. Severity criteria were noted for each patient using APACHE II and Ranson scoring system. Systemic complications were classified by Atlanta criteria and were developed in 19% of patients. Results: The serum values (median) of IL-6, IL-18 and sTNFr in complicated versus non-complicated AP were as follows: 104, 230, 2220 pg/ml vs. 20, 202, 1520 pg/ml ($P = 0.001$; 0.411 and 0.004). ROC analyses was performed and the area under curve (AUC) were calculated for serum IL-6 AUC = 0.41; cut-off 37.9 and for sTNFr AUC = 0.69; cut-off 1552 pg/ml. AUC for APACHE and Ranson scoring system were 0.63 and 0.75 with cut-off 9 and 4 respectively.

Conclusions: Results reveal that IL-6 is the best parameter out of three observed for early assessment of complicated acute pancreatitis, sTNFr is also good enough, but IL-18 has no significant value. The results suggested that pancreatitis classified as complicated in a large number of patients could be better predicted using Ranson scoring system that APACHE II.

e-mail: elizabeta.fisic@ri.t-com.hr

P05-3

Biokemijski pokazatelji statusa bakra te izračun koncentracije slobodnog bakra

Mujagić R¹, Vrkić N², Obuljen J³, Užović-Frakin I⁴,
Ferenec-Ružić D², Pizent A⁵

¹Medicinsko biokemijski laboratorij, Opća bolnica Pula, Pula

²Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

³Zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinika za dječje bolesti Zagreb

⁴Odjel za transfuziologiju, Opća bolnica Zadar, Zadar

⁵Jedinica za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

Uvod: Povišena koncentracija bakra pogoduje porastu oksidacijskog stresa. Međutim, u fiziološkim razinama bakar je nužan radi postizanja optimalne funkcije antioksidacijskog sustava obrane u ljudskom organizmu. Regulacija homeostaze bakra u organizmu pod nadzorom je jetre (sinteza ceruloplazmina). Osim što je transportni protein za bakar u krvnoj plazmi, ceruloplasmin ima značajnu fiziološku ulogu s obzirom na svoje oksidoreduktazno djelovanje čime potpomaže prijelaz željeza iz dvovalentnog u trovalentni ion. Sniženje aktivnosti ceruloplazmina može se odraziti na porast oksidacijskog stresa što pogoduje razvoju brojnih komplikacija u jetrenih bolesnika.

Materijali i metode: Uzorci krvi prikupljeni su od bolesnika (N = 33) s dijagnosticiranom bolešću jetre. Na zahtjev liječnika određivani su uobičajeni biokemijski pokazatelji statusa bakra: koncentracija bakra (Cu) i masena koncentracija ceruloplazmina (CPm). U ostatnim uzorcima seruma određeni su dodatni biokemijski pokazatelji statusa bakra: feroksidazna aktivnost ceruloplazmina (CPa) i aktivnost bakar/cink-superoksid-dismutaze (SOD). Nadalje, pomoću opće prihvaćene empirijske jednadžbe izračunana je koncentracija slobodnog bakra (Cusl) koja odgovara udjelu bakra koji nije vezan na ceruloplasmin: $Cusl [\mu\text{mol/L}] = Cu [\mu\text{mol/L}] - 47,2 [\mu\text{mol/g}] \times CPm [\text{g/L}]$.

Rezultati: Nađene su statistički značajne korelacije između Cu i CPm ($r_p = 0,865$; $P < 0,001$), CPa ($r_p = 0,780$; $P < 0,001$) te SOD ($r_p = 0,366$; $P = 0,036$), nadalje, između Cusl i CPm ($r_p = 0,529$; $P = 0,002$) te CPa ($r_p = 0,489$; $P = 0,004$). Očekivane statistički značajne korelacije nađene su između indirektnih biokemijskih pokazatelja statusa bakra (CPm, CPa, SOD) od kojih se po značajnosti izdvaja korelacija između CPm i CPa ($r_p = 0,890$; $P < 0,001$).

Zaključak: Istodobnim određivanjem standardnih biokemijskih pokazatelja i dodatnih funkcionalnih pretraga statusa bakra poput CPa te računskih parametara (Cu/CPm, Cu/CPa, CPa/CPm i Cusl) omogućen je potpuniji uvid u metabolizam i status bakra u jetrenim bolestima.

e-pošta: renat.mujagic@pu.t-com.hr

P05-3

Biochemical indicators of copper status and the calculation of free copper concentration

Mujagić R¹, Vrkić N², Obuljen J³, Užović-Frakin I⁴,
Ferenec-Ružić D², Pizent A⁵

¹Medical Biochemistry Laboratory, Pula General Hospital, Pula, Croatia

²University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

³Department of laboratory diagnostics, Zagreb Children's hospital, Zagreb, Croatia

⁴Department of Transfusiology, Zadar General Hospital, Zadar, Croatia

⁵Analytical Toxicology and Mineral Metabolism Unit, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatia

Background: High copper concentration favors the increase of oxidative stress. Nevertheless, in the physiological levels copper is essential for optimal function of the antioxidative defense system in the human body. Homeostasis of copper has been regulated by liver (ceruloplasmin synthesis). Besides its copper transport function in the blood plasma, ceruloplasmin has substantial physiological role according to its oxydoreductase activity which is responsible to support the iron transition from ferric to ferrous ion. A reduction of ceruloplasmin activity could be reflected on the increase of oxidative stress, which favors the development of numerous complications in patients with diagnosed liver disease.

Materials and methods: Blood samples (N = 33) had been collected from the patients with liver disease. At the request of the physician, serum samples were analyzed for standard biochemical indicators of copper status: copper concentration (Cu) and ceruloplasmin mass concentration (CPm). Additional biochemical indicators of copper status were determined in the residual samples: ceruloplasmin ferroxidase activity (CPa), and copper/zinc-superoxide dismutase activity (SOD). Furthermore, free copper concentrations (Cuf) were calculated by using the widely accepted empirical equation that corresponds to copper fraction which is not bound to ceruloplasmin: $Cuf [\mu\text{mol/L}] = Cu [\mu\text{mol/L}] - 47,2 [\mu\text{mol/g}] \times CPm [\text{g/L}]$.

Results: There were statistically significant correlations between Cu and CPm ($r_p = 0,865$, $P < 0,001$), CPa ($r_p = 0,780$, $P < 0,001$) and SOD ($r_p = 0,366$, $P = 0,036$), and furthermore, between Cuf and CPm ($r_p = 0,529$, $P = 0,002$), and CPa ($r_p = 0,489$, $P = 0,004$). Expected statistical correlations were found among the measured indirect biochemical indicators of copper status (CPm, CPa, SOD) with emphasis on the high significant correlation between CPm and CPa ($r_p = 0,890$, $P < 0,001$).

Conclusion: Simultaneous determination of standard and additional functional biochemical indicators of copper status such as CPa and calculated parameters (Cu/CPm, Cu/CPa, CPa/CPm, Cuf) allows a complete insight into overall metabolism and status of copper in the liver diseases.

e-mail: renat.mujagic@pu.t-com.hr

P05-4

Prva transplantacije jetre i gušterače u Hrvatskoj u pacijenta s cističnom fibrozom

Colić Cvrlje V¹, Juričić Lj², Kocman B¹, Humar I², Šurina B¹, Sertić J²

¹Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

²Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: Produljenje životnog vijeka u bolesnika s cističnom fibrozom (CF) dovelo je do povišene pojavnosti izvanplućnih komplikacija. Te komplikacije uključuju cirozu jetre, insuficijenciju gušterače, dijabetes te egzokrine poremećaje koji su značajni uzroci poboljšavanja i smrtnosti. Transplantacija jetre je postupak izbora u bolesnika s razvijenom cirozom, a nije rijetka i multiorganska transplantacija koja uključuje i jetru i gušteraču.

Prikaz slučaja: Bolesniku je u dobi od 10 godina na temelju nalaza genotipizacije za CFTR utvrđeno da je homozigotni nositelj mutacije delta F508 te postavljena dijagnoza za CF. U svrhu genotipizacije provedena je analiza za 32 mutacije metodama koje su uključivale PCR i kapilarnu elektroforezu. U bolesnika se razvijaju komplikacije koje rezultiraju insuficijencijom gušterače i dekompenziranom cirozom jetre, te je podvrgnut simultanoj transplantaciji gušterače i jetre u dobi od 20 godina. Za presatke su korišteni gušterača i jetra istog darivatelja. Imunosupresivna terapija uključuje peroralni takrolimus i mofetik mikofenolat.

Rezultati: Oporavak bolesnika je bio uredan, s normalnim testovima funkcije jetre te normalnom vrijednošću glukoze i HbA1c, neovisno o inzulinu. Nije bila potrebna nadomjesna terapija pankreatičnim enzimima, te je pacijent na običnoj ishrani. Dvije godine nakon transplantacije nije zabilježena niti jedna epizoda odbacivanja i nema znakova recidiva te se može zaključiti da je prva uspješna transplantacija jetre i gušterače u bolesnika s CF provedena u Hrvatskoj rezultirala poboljšanim životom pacijenta.

Zaključak: Istodobna transplantacija jetre i gušterače u pacijenta s CF omogućuje normalizaciju vrijednosti glukoze i uobičajenu prehranu pacijenata kojima je potrebna transplantacija jetre te je svakako metoda izbora za bolesnike s CF.

e-pošta: jadranka.sertic@kbc-zagreb.hr

P05-4

The first liver and pancreas transplantation in a cystic fibrosis patient in Croatia

Colić Cvrlje V¹, Juričić Lj², Kocman B¹, Humar I², Šurina B¹, Sertić J²

¹Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

²Clinical Institute for Laboratory Diagnosis, Zagreb University Hospital, Zagreb, Croatia

Background: Extended lifespan of cystic fibrosis (CF) patients has led to increased incidence of extrapulmonary complications which include liver cirrhosis, pancreatic insufficiency, diabetes and exocrine disorders as significant causes of morbidity and mortality. Liver transplantation is the method of choice in patients with developed cirrhosis, and multiorgan transplantation involving both liver and pancreas is also not infrequent.

Case report: Based on CFTR genotyping results, the patient was at the age of 10 years found to be a homozygous carrier of delta F508 mutation, which confirmed the diagnosis of CF. Genotyping comprised 32 mutation analysis using PCR and capillary electrophoresis methods. Complications developed in the patient, resulting in pancreatic insufficiency and decompensated liver cirrhosis, so he underwent simultaneous pancreas and liver transplantation at the age of 20 years. Pancreas and liver transplants of the same donor were used. Immunosuppressive therapy includes peroral tacrolimus and mycophenolate mofetic.

Results: Patient's recovery was normal, with normal liver function test results, and insulin independent glucose and HbA1c results. No pancreatic enzyme supplementation was needed and the patient was on normal diet. No rejection episode and no signs of relapse were observed two years posttransplant so that we may conclude that the first successful pancreas and liver transplant in a CF patient in Croatia resulted in improved life of the patient.

Conclusion: Simultaneous pancreas and liver transplantation in a CF patient allowed normalization of glucose levels and usual diet in a patient requiring liver transplantation and is certainly a method of choice for CF patients.

e-mail: jadranka.sertic@kbc-zagreb.hr

P05-5

Učestalost celijakije među djecom sa šećernom bolešću tipa 1 na sjevernom Jadranu

Aralica M, Matica J, Barbarić I, Severinski S, Štifter S

Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka

Uvod: Celijakija je jedna od najčešćih kroničnih bolesti dječjeg doba. Djeca sa šećernom bolešću češće oboljevaju od celijakije od svojih vršnjaka u općoj populaciji. Pojavnost celijakije ovisi i o regionalnoj pripadnosti. Serološko određivanje IgA protutijela na tkivnu transglutaminazu (IgA anti-tTG) u serumu, preporučena je metoda u dijagnostici celijakije dok je biopsija sluznice tankog crijeva zlatni standard. U našem istraživanju ispitali smo učestalost celijakije među djecom sa šećernom bolešću tipa 1 na sjevernom Jadranu.

Materijali i metode: U ispitivanoj skupini bilo je 80 djece (39 dječaka, 41 djevojčica; dob 1-18 godina, medijan starosti 12 godina). IgA anti-tTG u serumu određen je ELISA testom. Niti jedno dijete nije imalo deficit ukupnog serumskog IgA. U uzorcima biopata sluznice tankog crijeva učinjena je histološka analiza.

Rezultati: IgA anti-tTG bio je pozitivan u 13,7% djece (11/80). U toj skupini djece medijan trajanja šećerne bolesti bio je mjesec dana (raspon 2 dana-8 godina). Od 11 djece pozitivne na IgA anti-tTG, kod 5 djece učinjena je biopsija sluznice tankog crijeva. Histološka analiza prema modificiranim kriterijima po Marsh-u potvrdila je I stupanj oštećenja sluznice kod dvoje djece, II stupanj kod još dvoje i IIIa stupanj kod jednog djeteta.

Zaključak: U našem ispitivanju utvrdili smo visoki postotak IgA anti-tTG pozitivne djece sa šećernom bolešću što upućuje na neophodnost serološkog probiranja na celijaku u toj skupini. Medijan trajanja šećerne bolesti tipa 1 nije bio dug pa su oštećenja sluznice tankog crijeva bila umjerena. To ukazuje na važnost rane dijagnostike celijakije kod djece sa šećernom bolešću u svrhu prevencije oštećenja funkcije crijeva.

e-pošta: merica.aralica@ri.t-com.hr

P05-5

A prevalence of celiac disease in the group of diabetic children in North-Adriatic part of Croatia

Aralica M, Matica J, Barbarić I, Severinski S, Štifter S

Rijeka Clinical Hospital Centre, Croatia

Objective: Celiac disease (CD) is one of the most common chronic diseases in childhood. A prevalence of CD is higher in children with type 1 DM than in the general population and shows a regional variability. IgA anti-tissue transglutaminase (anti-tTG) assay is recommended for diagnosis of CD but duodenal biopsy is the gold standard. In this study we evaluated the prevalence of CD in the group of diabetic children in North-Adriatic part of Croatia.

Materials and methods: We tested 80 children (39 boys, 41 girls; age range 1-18 years, median 12 years). Serum IgA anti-tTG was measured by ELISA kit. There was no case of IgA deficiency in study group. Histological assessment was done on small bowel biopsy.

Results: IgA anti-tTG was positive in 13.7% children (11/80). In that group median duration of type 1 DM was one month (range 2 days-8 years). Biopsy specimens were examined in five of eleven serological positive children. According to the modified Marsh criteria in our group two children had type I, two had type II and one child had type IIIa histological changes in duodenal biopsy.

Conclusions: The high percent of CD serological positive children with type 1 DM observed in our study suggests a need of serological screening for CD. In our study group median duration of type 1 DM was short and in accordance with moderate reduction of duodenal mucosa in histological findings. It suggests an importance of early CD diagnostic in diabetic children in order to prevent small bowel function decline.

e-mail: merica.aralica@ri.t-com.hr

P05-6

Prognostička vrijednost serumske koncentracije C-reaktivnog proteina i elastaze u bolesnika s akutnim pankreatitisom

Fišić E¹, Bilić-Zulle L^{1,2}, Šupak Smolčić V¹

¹Zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka

²Katedra za medicinsku informatiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

Uvod: Rana procjena težine akutnog pankreatitisa (AP) ključna je za primjenu odgovarajućeg liječenja, odnosno sprječavanja razvoja mogućih, po život opasnih komplikacija bolesti. Cilj rada je utvrditi vrijednost koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP) i elastaze (E1) u krvi oboljelih od akutnog pankreatitisa u svrhu rane prognoze tijeka bolesti.

Ispitanici i metode: U serumu 150 bolesnika (medijan i raspon dobi 63 (20-91) godina; 47% muškaraca) oboljelih od AP izmjerili smo koncentraciju E1 enzimimunometrijskom (ELISA), a CRP imunoturbidimetrijskom metodom prvog i trećeg dana po zaprimanju na bolničko liječenje. Težinu bolesti procijenili smo s pomoću APACHE II prognostičkog bodovnog sustava, a pojavu sistemskih komplikacija uz pomoć Atlanta kriterija. Komplikacije je razvilo 19% bolesnika.

Rezultati: Koncentracija CRP-a i E1 u serumu prvog dana po prijemu nije se značajno razlikovala u bolesnika bez ili s komplikacijama bolesti: CRP 14,4 vs 15 mg/L; $P = 0,954$ i E1 5,7 vs 7,5 ng/L; $P = 0,249$, dok su trećeg dana vrijednosti između dvije skupine bolesnika značajno razlikovale; CRP 85 vs 216 mg/L; $P = 0,002$ i za E1 1,7 vs 2,5 ng/L; $P = 0,001$. Za vrijednosti izmjerene trećeg dana ROC analizom izračunata je površina ispod krivulje (AUC) s obzirom na pojavu komplikacija, za CRP AUC = 0,69 uz graničnu vrijednost 214 mg/L, a za E1 AUC = 0,70 uz graničnu vrijednost 1,5 ng/L.

Zaključak: Vrijednosti CRP-a i E1 trećeg dana po prijemu u bolnicu imaju značajnu vrijednost za procjenu razvoja komplikacija akutnog pankreatitisa.

e-pošta: elizabeta.fisic@ri.t-com.hr

P05-6

The prognostic value of serum C-reactive proteine and elastase in acute pancreatitis

Fišić E¹, Bilić-Zulle L^{1,2}, Šupak Smolčić V¹

¹Department of laborator diagnostics, Rijeka Clinical Hospital Centre, Croatia

²Department of Medical Informatics, Rijeka University School of Medicine, Rijeka, Croatia

Introduction: The early prognostic evaluation of acute pancreatitis (AP) is a key step in the appropriate management of the disease, and it helps to avoid the risk for development of systemic complications. The aim of the study was to evaluate the prognostic value of serum levels of CRP and E1 for AP in the clinical setting.

Participants and methods: E1 were analyzed by ELISA method, CRP by immunoturbidimetry in serum taken routinely from 150 patients (median and range of age 63 (20-91) years; 47% males) at the first and the third day after hospital admission. Severity criteria were noted for each patient using APACHE II scoring system. Systemic complications were classified by Atlanta criteria and were developed in 19% of patients.

Results: The serum levels of CRP and E1 at the first day of hospital admission were not significantly different between patients without or with complications: 14.4 vs 15 mg/L; $P = 0.954$ and 5.7 vs 7.5 ng/L; $P = 0.249$. Serum levels of the third day after admission were significantly different between groups, CRP were 85 vs 216 mg/L; $P = 0.002$ and E1 1.7 vs 2.5 ng/L; $P = 0.001$. ROC analyses was performed and the area under curve (AUC) were calculated for serum values measured the third day: for CRP AUC = 0.69, with cut-off of 214 mg/L and for E1 AUC = 0.70 with cut-off of 1.5 ng/L.

Conclusion: Serum concentrations of CRP and E1 measured the third day after hospital admission are valuable prognostic parameter for prediction of complications of AP.

e-mail: elizabeta.fisic@ri.t-com.hr

P06 – Endokrinologija**P06-1 (Usmeno priopćenje)****Kvantitativno određivanje gonadotropina i ovarijskih steroida tijekom menstruacijskog ciklusa na platformi Roche-Ellecsys**

Zec I, Bukovec Megla Ž, Krpan R, Marout J, Petek-Tarnik I, Krilić D

Endokrinološki laboratorij, Klinika za onkologiju i nuklearnu medicinu, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Cilj: Ispitati koncentracije hormona važnih za procjenu funkcije osovine hipofiza-jajnici u žena fertilne dobi tijekom menstruacijskog ciklusa.**Ispitanice i metode:** U studiju je bilo uključeno 35 ispitanica, prosječne dobi 32 ± 6 godina, s redovitim menstrualnim ciklusom (30 ± 2 dana). Uredni hormonski status smo potvrdili određivanjem koncentracija lutropina (LH), folitropina (FSH), estradiola (E2), ukupnog i slobodnog testosterona (T) te proteinskog nosača spolnih hormona (SHBG) u folikularnoj fazi (3.-5. dan ciklusa). U ovulacijskom periodu (13.-15. dan) određivali smo koncentracije LH, FSH i E2, a u luteinskoj fazi (20.-23. dan) koncentracije progesterona (P). Analize hormona proveli smo elektrokemiluminiscentnom metodom (ECLIA) na autoanalizatoru Roche-Ellecsys. Koncentracije slobodnog T izračunavali smo pomoću izmjerenih koncentracija ukupnog T i SHBG.**Rezultati:** Normalna distribucija izmjerenih parametara potvrđena je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Prosječne koncentracije hormona u folikularnoj fazi bile su: LH $5,6 \pm 3,0$ IU/L, FSH $7,1 \pm 2,0$ IU/L, E2 174 ± 65 pmol/L, ukupni T $1,03 \pm 0,5$ nmol/L, slobodni T $11,4 \pm 5,5$ pmol/L te SHBG $73,9 \pm 28,8$ nmol/L. U ovulacijskoj fazi su dobiveni slijedeći rezultati: LH $11,9 \pm 7,0$ IU/L, FSH $6,0 \pm 2,1$ IU/L, odnosno E2 734 ± 477 pmol/L. Prosječna koncentracija progesterona u luteinskoj fazi bila je $48,4 \pm 19,5$ nmol/L.**Zaključak:** Određivanje koncentracija hormona na analizatoru Roche-Ellecsys omogućava jednostavno i brzo mjerenje parametara menstruacijskog ciklusa u žena, što je osobito važno zbog pravovremenog isključivanja hormonskih poremećaja, odnosno liječenja stanja i bolesti praćenih ovarijskom disfunkcijom. Također, metoda je prikladna za kontinuirani nadzor ovarijske funkcije, kao i stimulacije ovulacije tijekom postupaka medicinski potpomognute oplodnje.e-pošta: ikulas@kbsm.hr**P06 – Endocrinology****P06-1 (Oral presentation)****Quantitative automated measurement of gonadotropins and ovarian steroid hormones during the menstrual cycles on the Roche-Ellecsys analyzer**

Zec I, Bukovec Megla Ž, Krpan R, Marout J, Petek-Tarnik I, Krilić D

Laboratory of Endocrinology, Clinics of oncology and nuclear medicine, Sestre milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Objective: To determine concentrations of hormones relevant for the evaluation of function of pituitary-ovarian axes in fertile women during the menstrual cycle.**Subjects and methods:** A total of 35 women aged 32 ± 6 years, with regular menstrual cycles (30 ± 2 days) were selected for the study. Normal hormone concentrations were confirmed by measurement of lutropin (LH), folitropin (FSH), estradiol (E2), total testosterone (T) and sex-hormone binding globulin (SHBG) in follicular phase (cycle day 3-5), LH, FSH and E2 in ovulation (cycle day 13-15) and progesterone (P) in luteal phase (cycle day 20-23). Measurements of hormones were performed by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) on Roche-Ellecsys analyzer. Concentrations of free testosterone (FT) were calculated on the basis of total T and SHBG concentrations.**Results:** Normal distributions of measured hormones were confirmed by Kolmogorov-Smirnov test. Mean concentrations of hormones in follicular phase were: LH 5.6 ± 3.0 IU/L, FSH 7.1 ± 2.0 IU/L, E2 174 ± 65 pmol/L, total T 1.03 ± 0.5 nmol/L, free T 11.4 ± 5.5 pmol/L and SHBG 73.9 ± 28.8 nmol/L, respectively. Average concentrations of hormones in ovulatory phase were: LH 11.9 ± 7.0 IU/L, FSH 6.0 ± 2.1 IU/L, odnosno E2 734 ± 477 pmol/L. Mean concentration of P in luteal phase was 48.4 ± 19.5 nmol/L.**Conclusion:** Determination of hormone levels on automated Roche-Ellecsys platform enables simple and fast measurements of relevant parameters for women's menstrual cycles. This is particularly important when assessment of hormones is needed for appropriate classification and treatment of hormone disorders. Also, this is an appropriate method for monitoring of ovarian function and ovarian stimulation in the procedures of assisted reproduction techniques.e-mail: ikulas@kbsm.hr

P06-2

Flavonoid miricetin sprječava oksidativno oštećenje izazvano D-glukozom u Hep G2 stanicama

Petlevski R¹, Frank S²

¹Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

²Sveučilište Karl-Franzens, Institut za medicinsku biokemiju i molekularnu biologiju, Graz, Austrija

Uvod: Hiperglikemija u šećernoj bolesti može izazvati oksidativni stres pomoću nekoliko mehanizama. To uključuje autooksidaciju glukoze, stvaranje produkata kasne glikacije (AGE) i aktivaciju poliolnog puta. Miricetin je flavonoid prisutan u voću i povrću, uključujući crveno vino, koji djeluje kao snažni antioksidans.

Materijali i metode: Cilj istraživanja bio je ispitati učinak flavonoida miricetina (Sigma, Co) u niskim koncentracijama (5×10^{-7} i 1×10^{-6} M) na koncentraciju ukupnog glutathiona (GSH) u Hep G2 stanicama. Glavna uloga GSH je eliminacija reaktivnih kisikovih spojeva (ROS).

Rezultati: U usporedbi s kontrolom, D-glukoza (20 mM) značajno smanjuje sadržaj GSH u Hep G2 stanicama (N = 9). Izlaganje Hep G2 stanica s glukozom niskoj dozi miricetina (5×10^{-7} M), tijekom četiri sata na 37 stupnjeva, rezultira značajnim porastom koncentracije GSH u usporedbi s Hep G2 stanicama koje nisu izložene djelovanju miricetina.

Zaključak: Rezultat pokazuje da u Hep G2 stanicama miricetin u niskim koncentracijama smanjuje oksidativno oštećenje izazvano glukozom.

e-pošta: rpetlevski@pharma.hr

P06-3

Važnost određivanja Anti-Mullerovog hormona u žena reproduktivne dobi s regularnim menstruacijskim ciklusom

Zec I¹, Tišlarić-Medenjak D¹, Posavec Lj¹, Bukovec Megla Ž¹, Šimundić AM², Kralik Oguić S³

¹Endokrinološki laboratorij, Klinika za onkologiju i nuklearnu medicinu,

²Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

³Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

⁴Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Cilj: Ispitati promjene koncentracija Anti-Mullerovog hormona (AMH) u žena s regularnim menstruacijskim ciklusom u odnosu na dob.

P06-2

Myricetin, a naturally occurring flavonoid, prevents D-glucose induced oxidative damage in Hep G2 cells

Petlevski R¹, Frank S²

¹University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia

²Institut für Medizinische Biochemie und Medizinische Molekularbiologie-Karl-Franzens-Universität, Graz, Austria

Introduction: Hyperglycemia in diabetes can induce oxidative stress in Hep G2 cells via several mechanisms. These include glucose autooxidation, the formation of advanced glycation end-products (AGE), and activation of the polyol pathway. Myricetin is a flavonoid compound found in many fruits and vegetables, including red wine, that acts as a powerful antioxidant.

Materials and methods: The aim of the present study was to investigate effect of the flavonoid myricetin (Sigma, Co) within a low concentration range (5×10^{-7} and 1×10^{-6} M) on the concentration of total glutathione (GSH) in Hep G2 cells. The major roles of GSH (gamma-glutamylcysteinylglycine) are to maintain the intracellular redox balance and to eliminate ROS in cells.

Rezultati: Compared with control incubation, D-glucose (20 mM) significantly lowering GSH content in Hep G2 cells (N = 9). Exposure the Hep G2 cells plus glucose to low dose myricetin (5×10^{-7} M) for 4 hours at 37 degrees C resulted in significant increased of the GSH level when compared with control cells.

Conclusion: These results demonstrate that myricetin in low concentration attenuates D-glucose induced damage in Hep G2 cells.

e-mail: rpetlevski@pharma.hr

P06-3

Importance of measurement of Anti-Mullerian hormone serum concentrations in women of reproductive age with regular menstrual cycles

Zec I¹, Tišlarić-Medenjak D¹, Posavec Lj¹, Bukovec Megla Ž¹, Šimundić AM², Kralik Oguić S³

¹Sestre milosrdnice University Hospital, Laboratory of Endocrinology,

²Clinics of oncology and nuclear medicine, Zagreb, Croatia

³University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

⁴Clinical Institute for Laboratory Diagnostics, Clinical Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia

Objective: To estimate the changes of Anti-Mullerian hormone concentrations in sera of fertile women with regular menstrual cycles.

Ispitanice i metode: U studiju je bilo uključeno 35 ispitanica, u dobi od 19 do 44 godine s redovitim menstrualnim ciklusom (30 ± 2 dana) i normalnim hormonskim statusom. Ispitanice su prema dobi podijeljene u skupinu do 30 godina i skupinu s više od 30 godina starosti. Hormonski status smo potvrdili određivanjem lutropina (LH), folitropina (FSH), estradiola (E2), ukupnog i slobodnog testosterona (T) te proteinskog nosača spolnih hormona (SHBG) u folikularnoj fazi (3.-5. dan). U ovulacijskoj fazi (13.-15. dan) određivali smo koncentracije LH, FSH i E2, odnosno progesterona (P) u luteinskoj fazi (20.-23. dan). Koncentracije AMH smo određivali u prvoj i drugoj fazi ciklusa, imuno-enzimometrijskom metodom (ELISA, DSL Inc.), a koncentracije ostalih parametara metodom elektrokemiluminiscencije (ECLIA) na autoanalizatoru Roche-Ellecsys.

Rezultati: U prvoj skupini bilo je 15 ispitanica prosječne dobi od 26 ± 3 godine, a u drugoj skupini 20 ispitanica prosječne starosti od 36 ± 4 godina. Kolmogorov-Smirnov test pokazao je normalnu distribuciju svih izmjerenih parametara. Mann-Whitney test nije pokazao razliku u koncentraciji AMH među skupinama ($P = 0,0693$). U 19 ispitanica odredili smo koncentraciju AMH i u ovulaciji. Wilcoxonovim testom nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentracijama AMH na početku ciklusa u odnosu na ovulacijsku fazu ($P = 0,3124$).

Zaključak: Preliminarni rezultati ne pokazuju statistički značajnu razliku koncentracija AMH u odnosu na dob u ispitanica s urednim hormonskim statusom i redovitim menstrualnim ciklusima. Daljnja istraživanja na većem broju ispitanica nužna su da bi smo pokazali korisnost određivanja AMH u prognostici slabljenja ovarijske rezerve prije ostalih pokazatelja ovarijske steroidogeneze.

e-pošta: ikulas@kbsm.hr

Subjects and methods: The study included 35 women from 19 to 44 years of age with regular menstrual cycles (30 ± 2 days) and normal hormonal profile. Women were separated in two groups, according to their age. First group consisted of women younger than 30 years and second, of women of 30 years or older, respectively. Hormone concentrations were examined by measurement of lutropin (LH), folitropin (FSH), estradiol (E2), total testosterone (T) and sex-hormone binding globulin (SHBG) in follicular phase (cycle day 3-5), LH, FSH and E2 in ovulation (cycle day 13-15) and progesterone (P) in luteal phase (cycle day 20-23). Measurements of hormones were performed by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) on Roche-Ellecsys analyzer. Concentrations of AMH were determined with enzyme immunoassay (ELISA, DSL Inc.) in follicular and ovulatory phase, respectively.

Results: The first group comprised 15 women at age 26 ± 3 and the second one included 20 women at age 36 ± 4 . Normal distributions of all measured parameters were confirmed by Kolmogorov-Smirnov test. Mann-Whitney test didn't prove significantly different AMH concentrations between groups ($P = 0.0693$). The measurements of AMH concentrations in both, follicular and ovulatory phase were performed in 19 women. Wilcoxon test did not confirm significant difference of AMH concentrations between follicular phase and ovulation ($P = 0.3124$).

Conclusion: Preliminary results didn't show significant difference of AMH levels in relation to woman's age who still having regular menstrual cycles and normal hormonal profile. In order to show usefulness of AMH determination as better indicator than other hormones which are usually measured as parameters of women's fertility, further studies on larger number of patients are necessary.

e-mail: ikulas@kbsm.hr

P06-4

Placentarni čimbenik rasta, plazmatski protein-A povezan s trudnoćom i korionski gonadotropin-beta u idiopatskom intrauterinom zastoju rasta

Čepić K, Dujmov I, Roje D, Mladina B, Šupe Domić D, Stanišić L

Klinički bolnički centar Split, Split

Uvod: Intrauterini zastoj rasta (IUZR) fetusa česti je poremećaj rasta i razvoja ploda. Osnovni čimbenici fetalnog rasta zasnivaju se na genetskom potencijalu, funkciji organizma majke, sposobnostima posteljice te utjecaju okoline. IUZR bez znakova preeklampsije naziva se još idiopatski ili normotenzivni. Ljudski placentarni čimbenik rasta

P06-4

Human placental growth factor, pregnancy-associated plasma protein A and human chorionic gonadotropin-beta in idiopathic intrauterine growth restriction

Čepić K, Dujmov I, Roje D, Mladina B, Šupe Domić D, Stanišić L

Split University Hospital Center, Split, Croatia

Introduction: Complex genetic and environmental mechanisms of maternal, fetal and placental origin regulate fetal growth and may contribute to intrauterine growth restriction (IUGR). Placental growth factor (PGF), a member of the vascular endothelial growth factor family, is produced chiefly by the placenta and is a potent an-

(PGF) je član obitelji vaskularnih endotelijalnih čimbenika rasta i luči ga placenta. Plazmatski protein-A povezan s trudnoćom (PAPP-A) veliki je glikoprotein kojeg također luči placenta i pripada cink-peptidazama. Beta-hCG je sialoglikoprotein i luče ga trofoblastne stanice placente. Cilj ovog rada (kao dio mnogo opsežnije studije) bio je usporediti PGF, PAPP-A i beta-hCG u grupi trudnica sa IUZR i kontrolnom grupom.

Ispitanice i metode: 32 trudnice sa IUZR uspoređivane su sa 48 normalnih kontrola na početku poroda. Serumске koncentracije PGF, PAPP-A i beta-hCG određivane su imunoenzimskim testovima ELISA, odnosno CMIA (Total beta-hCG). Za usporedbu rezultata između skupina korišten je Mann-Whitney U test. Analiza korelacije provedena je Pearsonovim koeficijentom korelacije.

Rezultati: Koncentracije PGF, PAPP-A i beta-hCG nisu bile statistički značajno različite u trudnica sa IUZR u usporedbi sa kontrolnom skupinom (median; min-max; 84,72, 26,90-626,59 prema 74,83, 8,17-474,04 pg/mL, $P = 0,885$; 410,8, 66,7-2039,3 prema 324,9, 38,9-1469,9 ug/mL, $P = 0,105$; i 16182, 846-42391 prema 16938, 1527-105672 mIU/mL, $P = 0,960$). Pozitivnu korelaciju našli smo između beta-hCG i PAPP-A ($r = 0,3642$; $P = 0,001$).

Zaključak: Zaključujemo da nema značajne razlike između koncentracija PGF, PAPP-A i beta-hCG u serumu trudnica sa IUZR u odnosu na kontrolnu skupinu. Ali, dokazali smo postojanje statistički značajne povezanosti između koncentracija beta-hCG i PAPP-A.

e-pošta: katarina.cepic@kbsplit.hr

giogenic factor. Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) is a large zinc-binding protein produced by the developing placenta. Human chorionic gonadotropin-beta (β -hCG) is a sialoglycoprotein and is initially secreted by the trophoblastic cell of the placenta. The aim of this study (as a part of a large, comprehensive study) was to evaluate PGF, PAPP-A and beta-hCG levels in groups of pregnant women with IUGR and control group as a indicator for diagnosis of IUGR.

Subjects and methods: 32 women with IUGR were compared with 48 normal controls at the beginning of labour. PGF and PAPP-A serum level was assayed with an enzyme-linked immunosorbent assay. Serum level of Total beta-hCG was measured by chemiluminiscent microparticle immunoassay. Comparisons were made by using the Mann-Whitney U test for nonparametric data. Also, the Pearson's coefficient of correlations was used for correlation analysis.

Results: We found that maternal levels of PGF, PAPP-A and Total beta-hCG were no significantly different in women with IUGR compared to controls (median; min-max; 84.72, 26.90-626.59 vs 74.83, 8.17-474.04 pg/mL, $P = 0.885$; 410.8, 66.7-2039.3 vs 324.9, 38.9-1469.9 ug/mL, $P = 0.105$; and 16182, 846-42391 vs 16938, 1527-105672 mIU/mL, $P = 0.960$; respectively). Between Total beta-hCG and PAPP-A we found positive coefficient of correlation ($r = 0.3642$, $P = 0.001$).

Conclusion: We conclude that there was no significant difference in the serum level of PGF, PAPP-A and Total beta-hCG between IUGR and control group. But, statistically significant correlations were found between levels of PAPP-A and Total beta-hCG.

e-mail: katarina.cepic@kbsplit.hr

P06-5

Metabolizam glukoze i piruvata te morfološka građa predimplantacijskih zametaka čovjeka

Tandara L, Tandara M

Klinički bolnički centar Split, Split

Cilj: Cilj rada bio je ustanoviti da li mjerenje potrošene glukoze i piruvata u mediju može imati ulogu u predviđanju razvoja predimplantacijskih zametaka i povećanju uspjeha izvantjelesne oplodnje.

Materijali i metode: Izvantjelesna oplodnja primijenjena je kod 80 parova. Ispitanici su bili podijeljeni u grupe prema kvaliteti zametaka i prema razini mjerenih parametara. Trodnevni zametci su klasificirani u pet grupa prema staničnosti, jednakosti blastomera i fragmentiranosti. Ko-

P06-5

Glucose and pyruvate metabolism and morphological structure in preimplantation human embryos

Tandara L, Tandara M

Split University Hospital Center, Split, Croatia

Aim: The aim of the study was to establish whether the measurement of consumed glucose and pyruvate can be helpful in foreseeing development of preimplantation embryos and increasing the success rate of in-vitro fertilisation.

Materials and methods: Extracorporeal fertilization was applied in 80 subjects. The study subjects were divided into groups according to the quality of the embryos and the level of parameters measured. Day 3 embryos we-

ličina potrošene glukoze i piruvata mjerena je kod 580 predimplantacijskih zametaka u 15 μ l medija u kojem su embriji inkubirani i mediju koji je služio kao kontrola mikrofluorometrijskom tehnikom.

Rezultati: Potrošnja piruvata znatno je veća od potrošnje glukoze kod ranih predimplantacijskih zametaka prije nego što glukoza postane glavni supstrat u stadiju blastociste. Pad kvalitete trodnevnih zametaka bio je povezan s padom potrošnje piruvata i glukoze. Trodnevni zametci ocijenjeni s 2 i 3 imali su statistički značajnu razliku u potrošnji piruvata ($P < 0,001$). Statistički značajna razlika u potrošnji glukoze ($P = 0,002$) utvrđena je između trodnevnih zametaka s ocjenom 2 i 3.

Zaključak: Prisutnost valjanog odnosa između morfološke kvalitete predimplantacijskih zametaka i potrošnje glukoze i piruvata može pomoći u odabiru kvalitetnih zametaka trećeg dana i osiguranju veće stope uspješnosti izvantjelesne oplodnje.

e-pošta: leida.tandara@gmail.com

re classified into five groups according to their cellularity, the identity of blastomeres and fragmentation. The quantity of consumed glucose and pyruvate was measured in 580 preimplantation embryos. The level of pyruvate and glucose were determined in 15 μ l of the medium in which the embryos were incubated and in the control medium by microfluorometric method.

Results: The consumption of pyruvate was much higher than the consumption of glucose in early preimplantation embryos before glucose became the main substrate at the blastocyst stage. Deterioration of the quality of day 3 embryos was related to a decrease in the consumption of pyruvate and glucose. The day 3 embryos rated 2 and 3 showed a statistically significant difference in the consumption of pyruvate ($P < 0.001$). A statistically significant difference in the consumption of glucose ($P = 0.002$) was found to exist between the day 3 embryos rated 2 and 3.

Conclusion: An appropriate relationship between morphology quality of preimplantation embryos and consumption of glucose and pyruvate in cultivation medium can be helpful in choosing the quality day 3 embryos and ensuring a higher success rate of in-vitro fertilization.

e-mail: leida.tandara@gmail.com

P06-6

Katalitičke koncentracije SOD, GPOD i katalaze kod dijabetičara bez i sa dijabetičkom retinopatijom

Galetović A, Salamunić I, Bilopavlović N, Tandara L

Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Split, Split

Uvod: Superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPOD) i katalaza su enzimi antioksidativnog sustava koji štiti organizam od slobodnih radikala i oksidansa. SOD pretvara O_2 u H_2O_2 , GPOD H_2O_2 i lipidne perokside u manje reaktivne molekule, a katalaza uklanja velike količine H_2O_2 nastalog djelovanjem oksidaze u peroksisomima. Reaktivni kisikovi spojevi uključujući i slobodne radikale u šećernoj bolesti rastu zbog autooksidacije glukoze i glikoziliranih proteina kao i uspostave sorbitolskog puta tijekom hiperglikemije. Povećana razina reaktivnih kisikovih spojeva i kompromitirana antioksidativna obrana kod dijabetičara mogla bi utjecati na pojavu dijabetičke retinopatije (DR).

Cilj ovog rada je procijeniti postoji li razlika u katalitičkim koncentracijama antioksidativnih enzima skupine dijabetičara bez DR (grupa A) i skupine dijabetičara s DR (grupa B) te ih usporediti sa vrijednostima kontrolne skupine.

P06-6

Catalytic concentrations of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in diabetic patients with and without diabetic retinopathy

Galetović A, Salamunić I, Bilopavlović N, Tandara L

Department of Medical Laboratory Diagnosis, Split University Hospital Center, Split, Croatia

Introduction: Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) and catalase are the enzymes of antioxidative system. The role of antioxidative system is elimination of free radicals and oxidants. SOD converts O_2 to H_2O_2 , GPX H_2O_2 and lipid peroxide to less reactive molecules and catalase removes H_2O_2 produced by activity of oxidases in peroxisomes. Autooxidation of glucose, glycosylated proteins and setting up of sorbitole pathway during hyperglycemia raise the amount of reactive oxygen species (ROS) and free radicals. The increased level of ROS and compromised antioxidative defence of diabetic could possibly interact with the development of diabetic retinopathy (DR).

This study aims to evaluate whether there is a difference in catalytic concentrations of antioxidative enzymes between two diabetic groups (Group A with DR and Group

Materijali i metode: Svaku skupinu činilo je 30 ispitanika. Katalitičke koncentracije SOD i GPOD određivane su u lizatu eritrocita, a katalaza u plazmi.

Rezultati: Katalitičke koncentracije sva tri enzima statistički značajno su snižene (Grupa A: SOD, $P < 0,001$; GPOD, $P = 0,030$; katalaza, $P = 0,001$; Grupa B: SOD, $P < 0,001$; GPOD, $P = 0,005$; katalaza, $P < 0,001$) u usporedbi sa skupinom zdravih ispitanika što je u skladu s dosada provedenim studijama i potvrđuje kompromitirani antioksidativni status dijabetičara. Vrijednosti katalitičkih koncentracija enzima u dvjema skupinama dijabetičara obuhvaćenih našim ispitivanjem nisu se statistički značajno razlikovale (SOD, $P = 0,451$; GPOD, $P = 0,375$; katalaza, $P = 0,546$).

Zaključak: Do sada provedene studije različitih autora pokazuju oprečne rezultate što se objašnjava različitim brojem ispitanika, različitim metodama mjerenja ili pak razlikama u dobi pacijenata, tipu i trajanju šećerne bolesti.

e-pošta: agalet@krizine.kbsplit.hr

B without DR N = 30) and to compare them with the control group (N = 30).

Materials and methods: Catalytic concentrations of SOD and GPX were determined in RBC lysate and catalase in plasma.

Rezultati: The results for all three enzymes were significantly lower in both diabetic groups (Group A: SOD, $P < 0.001$; GPX, $P = 0.030$; catalase, $P = 0.001$; Group B: SOD, $P < 0.001$; GPX, $P = 0.005$; catalase, $P < 0.001$) compared to the control group, and confirm the compromised antioxidative status of diabetic patients. There was not statistically significant difference of enzymes catalytic activity between the two diabetic group in our study (SOD, $P = 0.451$; GPX, $P = 0.375$; catalase, $P = 0.546$).

Conclusion: Inconsistent results obtained in a number of similar studies could be explained by different number of participants, different methods used, or differences in patients' age, type and duration of diabetes.

e-mail: agalet@krizine.kbsplit.hr

P07 – Koštani metabolizam

P07-1

Status D vitamina u bolesnika na kroničnom liječenju dijalizom i nakon transplantacije bubrega

Kušec V, Šmalcelj R

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: Poremećaj metabolizma minerala u kroničnom bubrežnom zatajenju posljedica je nedostatne sinteza kalcitriola zbog hiperfosfatemije i smanjenja bubrežnog parenhima. Sintaza 25-OHD u jetri nije poremećena, a nedostatak je posljedica načina života uslijed bolesti, te nakon transplantacije šteti oporavku poremećaja metabolizma minerala.

Cilj ovog rada je procjene statusa D vitamina mjerenjem 25-OHD u 101 bolesnika na kroničnom liječenju dijalizom (LD, 53 M, 48 Ž) i u 441 bolesnika s transplantiranim bubregom (TB, 250 M, 191 Ž). **Metode:** Koncentracija 25-OHD određena je ELISA kitom (IDS, Velika Britanija).

Rezultati: U LD bolesnika nije bilo značajne razlike u koncentraciji 25-OHD između spolova, a manjak (< 75 nmol/L) je nađen u 76% (77/101, $35,2 \pm 17,7$). U 24 bolesnika bez manjka 25-OHD je $118,8 \pm 49,4$ nmol/L (75-295). Značajno niži 25-OHD u zimskom razdoblju godine (listopad/ožujak) ($P < 0,001$) $27,9 \pm 16,1$ (N = 9) nego u ljetnom (travanj/rujan) $57,7 \pm 46,7$ (N = 92) je relativan zbog malog broja

P07 – Bone metabolism

P07-1

Vitamin D in patients on chronic dialysis treatment and kidney transplant recipients

Kušec V, Šmalcelj R

Clinical Institute for Laboratory Diagnostics, Zagreb Clinical Hospital Centre, Zagreb, Croatia

Introduction: Disorder of mineral metabolism in chronic kidney failure results from deficient calcitriol synthesis caused by hyperphosphatemia and kidney tissue loss. 25-OHD synthesis in the liver is not affected, its deficiency is a consequence of life style in sickness, and delays normalisation of mineral metabolism after kidney transplantation. The aim of this investigation was assessment of vitamin D status by measurement of 25-OHD in 101 patient on chronic dialysis (CD, 53 M, 48 F) and in 441 kidney transplant recipients (KT, 250 M, 191 F).

Methods: 25-OHD was measured by ELISA kit (IDS, UK).

Results: In CD patients no difference in 25-OHD between sexes existed, and deficiency (< 75 nmol/L) was present in 76% (77/101, $35,2 \pm 17,7$). In the remaining 24 patients 25-OH D was $118,8 \pm 49,4$ (75-295). Significantly lower ($P < 0.001$) 25-OHD in the winter period (October/March; $27,9 \pm 16,1$, N = 9) than in summer (April/September; $57,7 \pm 46,7$, N = 92) was considered relative due to small sample. In KT patients 25-OHD was lower in women ($45,9 \pm$

bolesnika. U TB bolesnika 25-OHD je u žena ($45,9 \pm 26,3$; $P < 0,005$) niži nego u muškaraca ($60,7 \pm 38,0$), ali nema razlike tijekom godine. U 77% (340/441) TB bolesnika postoji manjak 25-OHD, a u 101 iznosi $101,9 \pm 31,8$ (75-262). Nema razlike između dvije skupina bolesnika niti između spolova za sve. Manjak 25-OHD je u 71% muškaraca (216/304) i 84% (201/239) žena za sve. Manjak D vitamina je nađen u > 75% ovih bolesnika, bez razlike prema osnovnom stanju. U žena je manjak učestaliji i nakon transplantacije su koncentracije niže nego u muškaraca. Doba godine nije utjecalo na 25-OHD.

Zaključak: Veliki udio manjka 25-OHD u žena je nepovoljan je čimbenik nastanka osteoporoze i poremećaja mineralnog metabolizma.

e-pošta: vkusec@kbc-zagreb.hr

P08 – Molekularna dijagnostika

P08-1 (Usmeno priopćenje)

Detekcija točkaste mutacije T315I kod bolesnika rezistentnih na terapiju imatinib- mesilatom

Horvat I, Radić Antolic M, Zadro R

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: Kronična mijeloična leukemija (KML) je mijeloproliferativna bolest karakterizirana nastankom fuzijskog gena BCR-ABL, a posljedično time i fuzijskog proteina bcr-abl. Iako je otkrićem imatinib-mesilata poboljšano liječenje bolesnika s KML, kod manjeg broja bolesnika nakon određenog vremena dolazi do rezistencije na lijek. Jedan od mogućih razloga rezistencije su mutacije u kinaznoj domeni abl. Jedina mutacija rezistentna na danas dostupne tirozin-kinazne inhibitore je točkasta mutacija T315I. Cilj rada bio je detektirati je li prisutnost mutacije T315I uzrok porasta, odnosno visoke razine prijepisa bcr-abl.

Materijali i metode: U istraživanje su bila uključeno 24 bolesnika s KML te neodgovarajućim odgovorom na terapiju imatinib-mesilatom: suboptimalni odgovor na terapiju imalo je 10 bolesnika, 8 bolesnika uopće nije odgovorilo na terapiju, dok je u 6 bolesnika došlo do > 1 log povećanja fuzijskog prijepisa bcr-abl progresivno kroz vrijeme. Napravljen je ASO-PCR prema protokolu Kanga i sur. (Haematologica, 2006; 91:659). Kao pozitivna kontrola, korišten je uzorak DNA bolesnice kod koje je dokazano postojanje mutacije T315I.

Rezultati: Metodom ASO-PCR otkrivena je točkasta mutacija T315I u 4/24 bolesnika (17%). Svi bolesnici kod ko-

26.3; $P < 0.005$) than in men (60.7 ± 38.0), but no difference existed during the year. Deficiency was found in 77% (340/441) KT patients, and in the remaining 101 was 101.9 ± 31.8 (75-262). No difference between sexes was found. In the entire group 25-OHD deficiency was present in 71% men (216/304) and 84% women (201/239). Vitamin D deficiency was found in > 75% patients, without difference regarding diagnosis. In women deficiency was more frequent and after kidney transplantation 25-OHD was less than in men. The seasons did not influence 25-OHD.

Conclusion: Large proportion of 25-OHD deficiency in women is a negative risk factor for osteoporosis and mineral metabolism disorder.

e-mail: vkusec@kbc-zagreb.hr

P08 – Molecular diagnosis

P08-1 (Oral presentation)

T315I mutation detection in patients resistant to imatinib mesylate therapy

Horvat I, Radić Antolic M, Zadro R

Clinical Institute for Laboratory Diagnostics, Zagreb Clinical Hospital Centre, Zagreb, Croatia

Introduction: Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disease characterized by the presence of BCR-ABL fusion gene and consequently bcr-abl fusion protein. Although the discovery of tyrosine kinase inhibitor (TKI), imatinib mesylate, improved the treatment of CML patients, a proportion of patients develop resistance to drug resulting in increased bcr-abl level. One of possible reasons for resistance are mutations in ABL kinase domain. Some mutations can be overcome by increasing the drug dose or by using the new generation of TKI. The only mutation resistant to currently available TKI is T315I. The aim of this study was to detect if the presence of T315I is the cause for increase or constantly high bcr-abl level.

Materials and methods: Twenty-four CML patients with inadequate response to therapy were included in the study: 10 patients with suboptimal response, 8 patients with failure in response to therapy and 6 patients with > 1 log increase of bcr-abl level over time. ASO-PCR for T315I detection was performed according to Kang et al (Haematologica, 2006; 91:659). Positive control was DNA sample from a patient with confirmed T315I mutation.

jih je dokazana mutacija imali su visoke vrijednosti razine prijevoda bcr-abl (12,7-38,1%; 24,9-26,1%; 12,5-30,4% prema međunarodnoj ljestvici te stalno pozitivan nalaz kvalitativnog PCR-a kod četvrtog bolesnika). Srednja vrijednost razine fuzijskog prijevoda u trenutku zahtjeva za otkrivanje mutacije u tih bolesnika iznosila je 23,1% te oni nisu reagirali na povećanje terapijske doze imatinib-mesilata.

Zaključak: Ovom metodom moguće je s osjetljivošću 1/1000 otkriti točkastu mutaciju T315I kao jedan od značajnih prognostičkih faktora tijeka bolesti jer je izbor liječenja za nosioce te mutacije transplantacija koštane srži.

e-pošta: ivanahorvat13@gmail.com

Results: T315I was detected in 4/24 patients (17%). All patients with mutation had high bcr-abl levels (12.7-38.1%; 24.9-26.1%; 12.5-30.4% according to International Scale and permanently positive qualitative PCR for the last patient). Mean bcr-abl level before the mutation request for all 4 patients was 23.1% and the patients did not respond to the increase of therapeutic dose.

Conclusion: ASO-PCR enables, with sensitivity of 1/1000, detection T315I which is one of important prognostic factors for disease course as the treatment of choice for mutation carriers is bone marrow transplantation.

e-mail: ivanahorvat13@gmail.com

P08-2 (Usmeno priopćenje)

Genetički polimorfizam tiopurinmetiltransferaze u hrvatskih bolesnika s upalnom bolesti crijeva

Čuković-Čavka S¹, Božina N², Ladić A¹, Krznarić Ž¹, Sertić J², Vucelić B¹

¹Zavod za gastroenterologiju, Interna klinika, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

²Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: Tiopurini su važni lijekovi koji se koriste između ostalog i u liječenju refraktornih ili o steroidima ovisnih bolesnika s upalnom bolesti crijeva. Lijek postaje aktivan metilacijom pomoću enzima tiopurinmetiltransferaze (TPMT). TPMT pokazuje varijabilnu interindividualnu aktivnost povezanu s genetičkim polimorfizmom. Stoga TPMT genotip predstavlja predispoziciju za interindividualne razlike u učinkovitosti lijeka i razvoj nuspojava. Istraživanja su ukazala na potrebu genotipizacije TPMT prije početka terapije tiopurinima. S obzirom na različitu pojavnost polimorfnih TPMT alela u pojedinim populacijama (u bijeloj populaciji oko 11%) cilj ovog istraživanja bio je odrediti učestalost najčešćih polimorfnih varijanti TPMT u naših bolesnika s upalnom bolesti crijeva (UBC).

Bolesnici i metode: Alelne varijante TPMT gena (*2, *3A, *3C) su određene metodama temeljenim na polimeraznoj lančanoj reakciji (PCR-RFLP i PCR u stvarnom vremenu - Real-time PCR) u 326 odraslih bolesnika s upalnom bolesti crijeva.

Rezultati: Među bolesnicima uključenim u studiju, 9 je bilo heterozigotnih za polimorfni alel TPMT (2,7%), dok je ostatak imao alele divljeg tipa (*1). Učestalost deficitarnih alela TPMT*2, *3A, i *3C je bila 0,6%, 0,9% i 1,2%.

P08-2 (Oral presentation)

Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase in croatian inflammatory bowel disease patients

Čuković-Čavka S¹, Božina N², Ladić A¹, Krznarić Ž¹, Sertić J², Vucelić B¹

¹Division of Gastroenterology, Zagreb University Hospital Centre, Zagreb, Croatia

²Clinical Institute for Laboratory Diagnostics, Zagreb Clinical Hospital Centre, Zagreb, Croatia

Introduction: Thiopurines are important drugs used in the treatment of steroid-dependent and refractory inflammatory bowel disease. They exhibit their activity once they are metabolized via methylation by thiopurine methyltransferase (TPMT) enzyme. TPMT displays a range of activities due to genetic polymorphism meaning that frequency of certain TPMT alleles determines interindividual variations. Therefore the likelihood of adverse effect and interindividual differences in therapeutic efficacy may relate to TPMT genotype. It was established in some studies that TPMT testing should be introduced prior to the initiation of thiopurines in therapy. Regarding to different frequencies of polymorphic TPMT alleles reported from different populations (in Caucasians 11%) the aim of this study was to evaluate the frequency of the most common TPMT variants in our inflammatory bowel disease patients (IBD).

Patients and methods: The allelic variants of the TPMT gene (*2, *3A,*3C) were analyzed by polymerase chain reaction-based assays (PCR-RFLP and Real-time PCR) in 326 adult IBD patients.

Results: Among the patients enrolled in the study, 9 patients were heterozygous for a variant TPMT allele (2.7%),

Zaključak: TPMT*3C je najučestaliji nefunkcionalni alel TPMT u hrvatskih bolesnika s upalnom bolesti crijeva. S obzirom na nisku pojavnost polimorfnihi alela TPMT preporučuje se testirati i kontrolnu skupinu zdravihi ispitanika prije konačnih zaključaka o doziranju tiopurinskihi lijekova na osnovi farmakogenetičkih podataka u našoj populaciji.

e-pošta: nbozina@kbc-zagreb.hr

while the rest had a wild-type allele. Frequencies of deficient alleles TPMT*2, TPMT*3A, and TPMT*3C were 0.6%, 0.9% and 1.2% respectively.

Conclusion: TPMT*3C was the most frequently occurring nonfunctional TPMT allele in Croatian IBD population. Regarding to relatively lower frequency of TPMT polymorphisms we need further investigation in cohort of healthy controls prior definite conclusion about benefit of pharmacogenetically guided dosing in our population.

e-mail: nbozina@kbc-zagreb.hr

P08-3 (Usmeno priopćenje)

Parcijalna monosomija 4q i parcijalna trisomija 13q: prikaz fenotipa i određivanje kromosomskih točaka loma molekularnim metodama

Wagner J¹, Dorner S², Stipoljev F³, Lauc G¹, Liehr T⁴, Brečević L⁵

¹Medicinski fakultet Osijek, Osijek

²Klinička bolnica Osijek, Osijek

³Opća bolnica Sveti Duh, Zagreb

⁴Institut za humanu genetiku i antropologiju, Jena, Njemačka

⁵Hrvatski institut za istraživanje mozga, Zagreb

Uvod: Fenotipi pacijenata s djelomičnom aneuploidijom često se razlikuju svojim kliničkim manifestacijama ovisno o veličini kromosomske regije uključene u promjenu. Delecije kromosomskih regija 4q31, 4q32 i 4q33-4qter uzrokuju delecija 4q malformacijski sindrom koji uključuje facijalnu dismorfiju, kardiološke poremećaje, defekte udova i zastoj u razvoju. Distalnije 4q delecije, koje uključuje pruge 4q34-q35, nađene su u pacijenata s manje teškim oblikom mentalne retardacije i s manje karakterističnim značajkama sindroma delecija 4q. Parcijalna trisomija 13q (13q14-qter) također je opisana kao karakterističan fenotip koji uključuje tešku mentalnu retardaciju poput one kod trisomije 13. Iako del4q sindrom i dup13q sindrom mogu varirati u svojim fenotipskim značajkama, oni imaju i nekoliko zajedničkih karakteristika. U ovom radu prikazujemo kliničke i molekularne značajke jednogodišnje djevojčice s kariotipom 46,XX,der(4)t(4;13)(q34.1;q14.3)mat, čiji fenotip odražava značajke dvaju različitih sindroma.

Metode: Kromosomske točke lomova i veličina kromosomskih segmenata uključenih u kromosomsku preraspodjelu utvrđeni su metodom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) uporabom proba za specifično molekularno pruganje kromosoma 4 i 13 (MCB4, MCB13), subtelomernih proba za regije 13qter i 4qter te BAC proba za regije 13q21.1 i 13q14.3.

P08-3 (Oral presentation)

Partial monosomy 4q and partial trisomy 13q: phenotype and molecular mapping of the breakpoints

Wagner J¹, Dorner S², Stipoljev F³, Lauc G¹, Liehr T⁴, Brečević L⁵

¹School of Medicine Osijek, Osijek, Croatia

²Osijek University Hospital, Osijek, Croatia

³Sveti Duh General Hospital, Zagreb, Croatia

⁴Institute for human genetics and anthropology, Jena, Germany

⁵Croatian Institute for Brain Research, Zagreb, Croatia

Introduction: Phenotype in patients with segmental aneuploidy often vary in their clinical manifestation depending on the size of the chromosomal region involved. Deletions of chromosome regions 4q31, 4q32, and 4q33-4qter lead to a distinctive malformation syndrome (deletion 4q syndrome) of facial dysmorphism, cardiac and limb defects and developmental delay. More distal 4q deletions involving bands q34-q35 have been found in patients presenting with less characteristic features and less severe mental retardation. Partial trisomy 13q (13q14-qter) has also been shown to cause a characteristic phenotype associated with severe mental deficiency resembling that of trisomy 13. Although del4q and dup13q syndromes vary in their phenotypes, they have also several features in common. Herein presented are the clinical and molecular findings in a 1-year-old female with a karyotype 46,XX,der(4)t(4;13)(q34.1;q14.3)mat, whose phenotype exhibits the features of the two distinctive syndromes.

Methods: The chromosome breakpoints and the size of segments involved in the rearrangement were determined by FISH applying chromosome 4 and 13 specific molecular banding (MCB), subtelomeric probes for 13qter and 4qter, and BACs mapped in 13q21.1 and 13q14.3, respectively.

Rezultati: Primjenjujući shemu 169 array-mapiranih MCB knjižnica prema Weise i sur., 2008, utvrđeno je da duplikacija kromosomske regije 13q uključuje 73,95 Mb dok delecija kromosoma 4 uključuje 14,6 Mb.

Zaključak: Budući prikazi slučajeva koji će biti detaljno klinički i molekularno opisani, doprinit će detaljnijoj karakterizaciji delecija 4q sindroma te će ukazati na regije kromosoma 13 odgovorne za razvoj trisomija 13 sindroma.

e-pošta: jwagner@mefos.hr

Results: According to the labeling scheme for all 169 array-mapped MCB libraries (Weise *et al.*, 2008) it was estimated that the duplication encompassed 73.95 Mb of 13q, and the deletion of chromosome 4 14.6 Mb. The report of further cases with very good clinical and molecular characterization will add to a more precise description of the deletion 4q syndrome and will pinpoint the critical region on chromosome 13 responsible for trisomy 13.

e-mail: jwagner@mefos.hr

P08-4 (Usmeno priopćenje)

Rano otkrivanje promjena genoma tehnikom I - FISH u bolesnika sa staničnom atipijom sedimenta urina

Franić Šimić I

Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: Karcinom mokraćnog mjehura jedan je od vodećih karcinoma u muškoj populaciji. Oko 90.000 slučajeva dijagnosticira se u Europi i 260.000 u svijetu. Visoko osjetljivim, specifičnim i ne invazivnim tehnikama molekularne biologije kao što je interfazni FISH (I-FISH) moguće je detektirati promjene genoma u stanicama sedimenta urina te tako razlikovati malignu atipiju stanica od benigne atipije. Cilj je bio ispitati i dokazati prisutnost promjena genoma u atipičnim stanicama sedimenta urina. Tehnikom I - FISH detektirane su numeričke i strukturne promjene (CEP3, CEP7, CEP 17 i LSI 9p21) u uzorcima urina s dokazanom staničnom atipijom.

Materijali i metode: UroVysion test omogućava istovremeno otkrivanje više različitih promjena u genomu jedne atipične stanice. Analizirano je 270 uzoraka urina u bolesnika kod kojih je bila prisutna stanična atipija.

Rezultati: Pozitivan nalaz nađen je u 113 (42%) bolesnika. U 24 (21%) bolesnika bile su prisutne numeričke i strukturne promjene, u 83 (74%) samo numeričke, a u 6 (5%) samo strukturne promjene.

Zaključak: Tehnikom I-FISH moguće je detektirati i pratiti poznate nam promjene genoma u stanicama tumora mokraćnog mjehura i na taj način razlikovati benignu od maligne stanične atipije.

e-pošta: ivafranic@yahoo.com

P08-4 (Oral presentation)

Early detection of genomic changes with I - FISH in patients with atypical cells in urine

Franić Šimić I

Zagreb Clinical Hospital Centre, Zagreb, Croatia

Introduction: Bladder cancer is one of the most prominent cancers in men. About 90,000 cases are newly diagnosed in Europe and 260,000 worldwide. With highly sensitive, specific and non invasive techniques of molecular biology, like I-FISH, it is possible to detect genomic changes in urine cells and in that way differentiate malignant and benign cells.

Materials and methods: UroVysion test detects aneuploidy of chromosomes 3, 7, 17 and loss of the 9p21 locus via fluorescence in situ hybridization (FISH). A total of 270 urine specimens were analysed.

Results: 113 (42%) specimens were positive. In 24 (21%) samples we found numerical and structural changes, in 83 (74%) only numerical changes and in 6 (5%) only structural changes.

Conclusion: I-FISH allows to detect genomic changes in bladder cancer cells and to differentiate between malignant and benign cells.

e-mail: ivafranic@yahoo.com

P08-5

Mutacija gena FLT3 (FLT3/ITD) u akutnoj mijeloičnoj leukemiji (AML)

Kardum Paro MM¹, Šiftar Z¹, Vrhovac R², Jakšić B²
¹Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

²Klinička bolnica Merkur, Zagreb

Uvod: FLT3 gen kodira FLT3 receptor s tirozin-kinaznom aktivnošću koji sudjeluje u proliferaciji i diferencijaciji hematopoetskih stanica. Mutacije FLT3 receptora u obliku intronskog tandemskeg udvajanja (ITD) u blizini jukstamembranske ili točkaste mutacije aspartanske kiseline 835 unutar kinazne domene (KD), uzrokuju njegovu aktivaciju. Varijacije ITD u duljini produkata umnažanja povezane su s nepovoljnim kliničkim značajkama i prognozom u odraslih bolesnika s *de novo* AML.

Cilj: Utvrditi postojanje FLT3/ITD mutacije u odraslih bolesnika s *de novo* AML metodom obrnute transkripcije – lančane reakcije polimeraze (RT-PCR) (Noguera NI i sur.).

Materijali i metode: Iz 20 uzoraka (14 uzoraka koštane srži i 6 venske krvi) odraslih bolesnika s *de novo* AML (11 muškaraca, 9 žena, medijan starosti 62 godine i raspona 36– 82 godina) su izolirane mononuklearne stanice. Za otkrivanje FLT3/ITD mutacije je korištena metoda Noguere i sur. uz početnice za ITD na eksonima 14 i 15. Nakon elektroforeze na agaroznom gelu produkt umnažanja divljeg tipa (FLT3/WT) ima veličinu od 130 parova baza (pb), dok je u pozitivnih uzoraka (FLT3/ITD+) prisutan i dodatni produkt umnažanja veći od 130 pb.

Rezultati: U negativnih uzoraka (FLT3/WT) dobiven je produkt umnažanja veličine 130 pb. U pozitivnih uzoraka (FLT3/ITD+) se uz produkt umnažanja veličine 130 pb nalazi i dodatni produkt umnažanja veći od 130 pb. 20% odraslih bolesnika s *de novo* AML (4/20) bilo je FLT3/ITD+ (3/14 uzoraka koštane srži; 21% i 1/6 venske krvi; 17%).

Zaključak: RT-PCR i elektroforeza na agaroznom gelu korisna je metoda probiranja FLT3/ITD u odraslih bolesnika s *de novo* AML. U daljnjem istraživanju je, poradi prognoze bolesti, potrebno odrediti točnu veličinu dodatnog produkta umnažanja.

e-pošta: mariana.kardum@zg.htnet.hr

P08-5

FLT3 gene internal tandem duplication (FLT3/ITD) in acute myeloid leukemia (AML)

Kardum Paro MM¹, Šiftar Z¹, Vrhovac R², Jakšić B²
¹Institute of Clinical Chemistry, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

²Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

Introduction: The FLT3 gene encodes a tyrosine kinase receptor that regulates proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells. Mutation of the FLT3 receptor, either by internal tandem duplication of the juxta-membrane domain (ITD) or by point mutation of the aspartic acid 835 of the kinase domain (KD), causes constant activation of the FLT3 receptor. Although FLT3/ITD is the most common mutation in adult *de novo* AML, they are variable in length and therefore associated with a poor AML prognosis.

Aim: To indicate the FLT3/ITD presence by reverse-transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) (Noguera NI et al.) in adult *de novo* AML patients.

Materials and methods: From 20 samples (14 bone marrows and 6 peripheral bloods) of adult *de novo* AML patients (11 men and 9 woman, median age of 62 years; range 36– 82 years) mononuclear cells were isolated. RT-PCR according to Noguera NI et al. with specific forward and reverse FLT3 primers on exons 14 and 15 and electrophoresis on agarose gel were used for indicating the FLT3/ITD presence. Negative cases (FLT3/WT) had one expected product of 130 base pairs (bp), whereas all positive cases had additional amplicon longer than the expected product of 130 bp.

Results: Negative cases (FLT3/WT) had only one expected product of 130 bp. All positive cases appeared on agarose gel as one additional amplicon longer than the expected product of 130 bp. 20% (4/20) of adult *de novo* AML patients were FLT3/ITD+ (3/14 bone marrows; 21% and 1/6 peripheral blood; 17%).

Conclusion: RT-PCR and electrophoresis on agarose gel is adequate as a screening method for FLT3/ITD presence in adult *de novo* AML patients. In the future their variability in length should be investigated because of AML prognosis.

e-mail: mariana.kardum@zg.htnet.hr

P08-6

Povezanost polimorfizama inzulinskog receptora (IR) i supstrata 1 inzulinskog receptora (IRS-1) s karcinomom prostate

Čipak A¹, Nikolac N¹, Šimundić AM¹, Reljić A², Justinić D², Vrkić N¹

¹Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

²Klinika za urologiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Uvod: Tijekom posljednjih godina nekoliko gena inzulinskog signalnog puta se povezuje s karcinomom prostate (KP). Dva od tih gena kandidata su: gen za inzulinski receptor (IR) i za supstrat 1 inzulinskog receptora (IRS-1). Oba gena su uključeni u procese stanične proliferacije, razvoja i rasta tkiva. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati povezanost polimorfizama IR 1058 C/T i IRS-1 G972R s karcinomom prostate. Također smo željeli ispitati moguću povezanost navedenih polimorfizama sa stadijem karcinoma procijenjenom prema Gleasonovom bodovanju.

Materijali i metode: Ispitali smo 119 bolesnika s KP, a u kontrolnu skupinu smo uključili 61 bolesnika s benignom hiperplazijom prostate (BHP). Bolesnici s KP podijeljeni su u podskupine s većim (Gleason stupnjevi 7-9) i manjim (Gleason stupnjevi 4-6) stupnjem malignosti. Polimorfizmi IR 1058 C/T i IRS-1 G972R genotipizirani su PCR-RFLP metodom.

Rezultati: Nije pronađena razlika u učestalosti genotipova ($P = 0,794$) niti alela ($P = 0,621$) IRS-1 G972R polimorfizma između KP i BHP skupina. Međutim, pronađena je značajna razlika u razdiobi genotipova i alela IR 1058 C/T polimorfizma. Nosioci polimorfnog alela (C/T+T/T) su bili učestaliji u skupini bolesnika s BHP nego u KP (54,10% prema 37,82%); $P = 0,040$; OR (95% CI) = 0,52 (0,28-0,96). Nije pronađena razlika u distribuciji IRS-1 niti IR polimorfizma u podskupinama prema Gleason bodovanju.

Zaključak: Pokazala se povezanost polimorfizma IR 1058 C/T s karcinomom prostate, dok za polimorfizam IRS-1 G972R povezanost nije dokazana. Niti jedan istraživani polimorfizam nije povezan sa stupnjem malignosti karcinoma prostate.

e-pošta: andrea.cipak@gmail.com

P08-6

Insulin receptor (IR) and insulin receptor substrate 1 (IRS-1) polymorphisms and prostate cancer

Čipak A¹, Nikolac N¹, Šimundić AM¹, Reljić A², Justinić D², Vrkić N¹

¹University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

²Department of Urology, Sestre milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Background: In recent years, a few genes in the insulin signalling pathway have been associated with prostate cancer (PC) susceptibility. Two such gene candidates are the insulin receptor (IR) and the insulin receptor substrate 1 (IRS-1) genes. Both, the IR and IRS-1 are involved in appropriate cell proliferation, tissue development and growth. The aim of this study was to examine the association of IR 1058 C/T and IRS-1 G972R polymorphisms with PC. We also aimed to examine possible association with cancer severity assessed by Gleason score.

Materials and methods: We have studied 119 patients with PC and 61 patients with benign prostate hyperplasia (BPH) as a control group. Patients with PC were divided into subgroups of higher (Gleason score 7-9) and lower (Gleason score 4-6) malignancies. The genotyping of two polymorphisms (IR 1058 C/T and IRS-1 G972R) was performed by the PCR-RFLP method.

Results: There was no difference in genotype ($P = 0.794$) nor allelic ($P = 0.621$) frequency of the IRS-1 G972R polymorphism between PC and BPH patient groups. However, there was a significant difference in IR 1058 C/T polymorphism genotype and allelic distribution. Carriers of the polymorphic allele (C/T+T/T) were more frequent in a group of BPH, than in the PC group (54.10% vs. 37.82%); $P = 0.040$; OR (95% CI) = 0.52 (0.28-0.96). No difference was found in IRS-1 and IR polymorphism distribution in subgroups according to Gleason score.

Conclusion: IR 1058 C/T polymorphism seems to be associated with prostate cancer, whereas IRS-1 G972R is not. Neither polymorphism is associated with the degree of prostate cancer malignancy.

e-mail: andrea.cipak@gmail.com

P08-7

Mutacije onkogenog bcr-abl u imatinibom liječenoj kroničnoj mijeloičnoj leukemiji

Marušić Vrsalović M¹, Livun A¹, Pejša V², Romić Ž¹, Kušec R^{1,2}

¹Zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinička bolnica Dubrava, Zagreb

²Interna klinika, Klinička bolnica Dubrava, Zagreb

Uvod: Ciljana terapija malom molekulom STI571 (imatinib), inhibitorom tirozin kinaze onkoproteina bcr-abl pokazuje značajan terapijski učinak u kroničnoj mijeloičnoj leukemiji (KML). Ipak, unatoč ovoj činjenici dio bolesnika razvija terapijsku rezistenciju.

Ispitanici i metode: Od 34 bolesnika na terapiji imatinibom u Kliničkoj bolnici Dubrava, petoro bolesnika pokazuje kvantitativnim PCR-om (TaqMan) konstantno mjerljive razine molekularnog biljega. Ove bolesnike smo testirali na prisutnost tri češće točkaste mutacije (Thr315Ile, Phe311Leu and Met351Thr) u abl dijelu bcr-abl onkogenog metodom ASO-DNA-PCR (osjetljivosti 1/10.000 stanica).

Rezultati: Nismo našli mutaciju Thr315Ile, dok je mutaciju Met351Th imalo svih petoro pacijenata, dvoje od njih i prije početka liječenja. Jedan je bolesnik dobio mutaciju Phe311Leu u tijeku terapije.

Zaključak: Povišena proporcija mutacija u tijeku liječenja sugerira klonalnu evoluciju bolesti. Također iz ovih podataka zaključujemo da pojava mutacija u abl dijelu bcr-abl onkogenog nije vezana samo za faze ubrzanja ili progresije bolesti, već da u nekim slučajevima mutacije mogu postojati i u kroničnoj fazi bolesti te prije liječenja imatinibom.

e-pošta: rkusec@irb.hr

P08-7

BCR-ABL oncogene mutations in imatinib treated chronic myeloid leukemia

Marušić Vrsalović M¹, Livun A¹, Pejša V², Romić Ž¹, Kušec R^{1,2}

¹Department for Laboratory Diagnostics, Dubrava University hospital, Zagreb, Croatia

²Department for Internal Medicine, Dubrava University hospital, Zagreb, Croatia

Introduction: Targeting the tyrosine kinase activity of BCR-ABL represents promising therapeutic strategy in chronic myeloid leukemia (CML). Despite remarkable efficiency of the tyrosine kinase inhibitor STI571 (imatinib), resistance in some patients has been observed.

Patients and methods: Out of 34 imatinib treated CML patients at University Hospital Dubrava, five of them were showing consistently high levels of BCR-ABL transcripts monitored by real-time PCR (TaqMan technology). We screened those patients for Thr315Ile, Phe311Leu and Met351Thr point mutations using allele-specific oligonucleotide (ASO)-DNA-PCR (with sensitivity of 1/10,000 cells).

Results: Thr315Ile mutations was not detected. All patients showed Met351Thr mutation and in two of them it was present prior to imatinib therapy. One patient acquired Phe311Leu mutation during imatinib therapy.

Conclusion: Increased proportion of mutated sequences during treatment detected by ASO-PCR suggests clonal evolution of mutated cells. Our data imply that in CML patients treated with imatinib, ABL mutations are not restricted to the accelerated phase of the disease, and that, in some cases, mutations occur in chronic phase of the disease and prior to STI571 therapy.

e-mail: rkusec@irb.hr

P08-8

Standardizacija kvantitativnog praćenja fuzijskog prijepisa bcr-abl prema međunarodnoj ljestvici

Horvat I¹, Radić Antolic M¹, Sertić D², Müller M³, Zadro R¹

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

²Zavod za hematologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

³Sveučilišna klinika, Mannheim, Njemačka

Uvod: Najčešći oblik praćenja tijeka kronične mijeloične leukemije bila je tehnika kvalitativnog PCR-a, no pojavom PCR-a u stvarnom vremenu omogućeno je kvantitativno praćenje prijepisa bcr-abl. S obzirom da je rezultat ovisan o odabiru sonde, „kućepaziteljskog gena“ te o upotrebi standardima, na prijedlog European Leukemia Net, podprojekt „Molecular monitoring“ pokrenuta je standardizacija kako bi se mogli uspoređivati rezultati dobiveni u različitim ustanovama.

Materijali i metode: Bilo je potrebno pripremiti izolate RNA 30 uzoraka određenog raspona prijepisa bcr-abl (0,001-10%), kvantificirati ih metodom koja se rutinski koristi u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku (KZLD), te iste uzorke poslati u referentni centar Sveučilišne klinike u Mannheimu, u svrhu dobivanja faktora pretvorbe i izražavanja rezultata prema međunarodnoj ljestvici (IS). Postupak je započet primitkom 4 uzorka različitih razrjeđenja prijepisa bcr-abl iz referentnog centra u kojima je izvršena kvantifikacija u svrhu dobivanja preliminarnog faktora pretvorbe. Slijedio je postupak dobivanja konačnog faktora pretvorbe u koji je bilo uključeno 30 uzoraka bolesnika. Iz svakog je uzorka pripremljeno 6 alikvota s 2×10^7 leukocita. Iz 3 alikvota napravljena je kvantifikacija prijepisa bcr-abl metodom koja se rutinski koristi u laboratoriju. Preostala 3 alikvota zajedno s rezultatima poslana su u referentni centar gdje je isti postupak ponovljen.

Rezultati: Usporedbom rezultata iz oba centra dobiven je preliminarni faktor pretvorbe 0,7830, a potom i konačni faktor pretvorbe 0,3911, kojim se rezultat dobiven u KZLD pretvara u rezultat prema IS.

Zaključak: Standardizacijom je omogućeno izražavanje rezultata prema IS te usporedivost rezultata s ostalim ustanovama. Na temelju praćenja dinamike u promjeni količine prijepisa bcr-abl moguće je lakše pratiti tijek bolesti i kvalitetnije odabrati način liječenja bolesnika.

e-pošta: ivanahorvat13@gmail.com

P08-8

Standardization of molecular monitoring of bcr-abl fusion transcript according to International Scale

Horvat I¹, Radić Antolic M¹, Sertić D², Müller M³, Zadro R¹

¹Clinical Institute for Laboratory Diagnostics, Zagreb Clinical Hospital Centre, Zagreb, Croatia

²Department of Hematology, Zagreb Clinical Hospital Centre, Zagreb, Croatia

³University Hospital, Mannheim, Germany

Introduction: The most frequent method for monitoring therapy in chronic myeloid leukemia patients was qualitative PCR. Development of quantitative real-time PCR enables nowadays relative bcr-abl quantification. The result depends on the probe and housekeeping gene selection as well as in the standards used. For this reason the subproject „Molecular Monitoring“ within the European Leukemia Net intends to standardize the results obtained in different laboratories.

Materials and methods: The aim of the study was to prepare 30 RNA samples that homogeneously cover a range of > 3 logs between 0.001 and 10% bcr-abl, to perform the quantification by the method routinely used in laboratory and to send the same samples to the reference laboratory of the Mannheim University Hospital in order to obtain conversion factor for expression of results according to International Scale (IS). The procedure started with the reception of 4 lysates with different dilutions of bcr-abl positive WBC in healthy donors WBC from reference laboratory.

Results: Quantification of bcr-abl was performed by the method routinely used in laboratory and the results sent to reference laboratory revealed the preliminary conversion factor of 0.7830. Next, 30 RNA samples were prepared in 6 aliquots, 2×10^7 WBC each. Bcr-abl quantification was performed in 3 aliquots. Other 3 aliquots together with the obtained results were sent to the reference laboratory where the same procedure was repeated. Comparison of results from both centers revealed the final conversion factor of 0.3911 that generates the results according to IS.

Conclusion: Standardization enables the expression of results according to IS and comparability of results within institutions. Monitoring of dynamics of the change in bcr-abl fusion transcript quantity enables proper disease monitoring and decision in treatment options.

e-mail: ivanahorvat13@gmail.com

P09 – Imunologija

P09-1 (Usmeno priopćenje)

Standardizacija koncentracije citokina u bronhoalveolarnom lavatu (BAL) albuminom

Fijačko M¹, Fijačko V², Kristek J³, Dobrošević B¹, Pavela J¹, Cetina N¹

¹Odjel za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Klinička bolnica Osijek, Osijek

²Odjel za plućne bolesti, Klinička bolnica Osijek, Osijek

³Odjel za torakalnu kirurgiju, Klinička bolnica Osijek, Osijek

Uvod: Tehnika BAL temelji se na postupku miješanja alikvota sterilne fiziološke otopine uvedene bronhoskopom sa obložnim epitelnim stanicama (OES). Kada se fiziološka otopina izvlači natrag aspiracijom, zajedno s njom dobivaju se OES i njene komponente. Međutim, dobivena bronhoalveolarna tekućina varijabilna je smjesa fiziološke otopine, OES i njenih komponenti. Interpretacija BAL nalaza otežana je zato što postupak nije precizno standardiziran. Napose, još uvijek nema zadovoljavajuće metode određivanja faktora dilucije tijekom lavože. Kao interni marker referentnog standarda za procjenu dilucije u široj upotrebi je albumin.

Materijal i metode: Koncentracije IL-1 beta, IL-6, IL-8 i albumina određene su u BAL 24 bolesnika (19 žena i 5 muškaraca, dobi 36-65 godina) sa plućnom sarkoidozom ELISA i turbidimetrijskom metodom. Naši su podatci prezentirani i kao omjer koncentracije citokina i koncentracije albumina u BAL, npr. koncentracija citokina u BAL izmjerena ELISA podijeli se sa koncentracijom albumina u BAL, i vrijednosti se izraze kao omjer količine citokina po mg albumina (standardizirana koncentracija citokina u BAL).

Rezultati: Koncentracija citokina u BAL pozitivno korelira sa standardiziranom koncentracijom citokina u BAL (za IL-1 beta $r = 0,999$, $P < 0,001$; za IL-6 $r = 0,7969$, $P < 0,05$, i za IL-8 $r = 0,976$, $P < 0,001$). Međutim, međusobno pozitivno koreliraju ove standardizirane koncentracije citokina.

Zaključak: Ovaj postupak standardizacije uklanja varijacije dilucije i omogućuje usporedbu između podataka raznih analiza i istraživača.

e-pošta: fjacko.mirjana@kbo.hr

P09 – Immunology

P09-1 (Oral presentation)

Standardization of cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) with albumin

Fijačko M¹, Fijačko V², Kristek J³, Dobrošević B¹, Pavela J¹, Cetina N¹

¹Institute for Clinical Laboratory Diagnostics, Osijek University Hospital, Osijek, Croatia

²Institute for Pulmonary Disease, Osijek University Hospital, Osijek, Croatia

³Institute for Thoracic Surgery, Osijek University Hospital, Osijek, Croatia

Background: The technique of BAL is based on the concept that aliquots of sterile normal saline solution infused through the bronchoscope mix with epithelial lining fluid (ELF). When the saline solution is recovered by aspiration, the ELF and its components are recovered along with it. However, the recovered BALF is a variable mixture of saline solution, ELF and ELF components. The interpretation of BALF findings is still hindered because the procedure cannot be precisely standardized. In particular, there is still no satisfactory method of determining the dilution factor during lavage. Albumin is widely used as an internal marker as reference standard to assess dilution.

Material and methods: We dosed the BALF concentrations of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and albumin in 24 patients (19 female and 5 male, age 36-65) affected by pulmonary sarcoidosis, using the ELISA and turbidimetric method. We also presented our data as ratios of the concentration of cytokines to the concentration of albumin in BALF, i.e. the crude BALF cytokine levels directly measured by ELISA were divided by the BALF albumin levels, and data were given as ratios of the amount of cytokine per milligram of albumin (standardized BALF cytokine levels).

Results: BALF cytokine levels correlated positively with standardized BALF cytokine levels (for IL-1 beta $r = 0.999$, $P < 0.001$; for IL-6 $r = 0.7969$, $P < 0.05$, and for IL-8 $r = 0.976$, $P < 0.001$). Moreover, these standardized cytokine levels were strongly mutually correlated.

Conclusion: This standardization method removes the variable of dilution and allows comparison between data from different subjects and investigators.

e-mail: fjacko.mirjana@kbo.hr

P09-2

Eozinofilni kationski protein, IgE i eozinofili u astmatične djece

Klasić A¹, Beljan B², Kozić-Dokmanović S³, Oršolić Lj⁴, Bukovec Megla Ž⁵, Getaldić B⁶

¹Specijalna bolnica za medicinsku rehabilitaciju Krapinske Toplice, Krapinske Toplice

²Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka

³Klinika za infektivne bolesti Fran Mihaljević, Zagreb

⁴Opća bolnica Slavonski Brod, Slavonski Brod

⁵Endokrinološki laboratorij, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

⁶Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Uvod: Eozinofilni kationski protein (ECP) je bazični protein lokaliziran u matriksu eozinofila. Tijekom različitih upalnih stanja, uključujući astmu, ECP se oslobađa u procesu degranulacije eozinofila, a vrijednosti u serumu proporcionalne su jačini alergijske upale. Poznato je da je IgE marker za atopiju kod astmatičnih bolesnika.

Ciljevi istraživanja bili su: usporediti koncentracije ECP u serumu ispitanika sa astmom i kod ispitanika sa nespecifičnim respiratornim bolestima(NSRD) sa apsolutnim brojem eozinofila u perifernoj krvi i koncentracijom IgE u serumu, te usporediti vrijednosti ovih parametara unutar obje skupine.

Materijali i metode: Kvantitativno mjerenje ECP i IgE u serumu provedeno je automatiziranim komercijalnom metodom FEIA (ImmunoCAP 100,Sweden) u skupini kod 42 astmatične djece i kod 45 djece sa nespecifičnim respiratornim bolestima(NSRD). U uzorcima krvi eozinofili su određivani na hematološkom brojaču Abbott CD 3200.

Rezultati: Premda su pronađene veće koncentracije za sva tri parametra kod astmatične djece u odnosu na djecu sa NSRD, nije nađena statistički značajna razlika ($P > 0,05$). U skupini astmatične djece, koncentracije ECP i IgE pokazale su slabo prihvatljivu korelaciju ($r = 0,384$; $P = 0,012$), dok u istih pacijenata koncentracije ECP i broj eozinofila pokazuje umjerenu korelaciju ($r = 0,522$; $P < 0,01$). U skupini djece sa NSRD nije bilo statistički značajne razlike između koncentracija ECP i IgE ($r = 0,025$; $P = 0,87$), niti između ECP i broja eozinofila ($r = 0,06$; $P = 0,68$).

Zaključak: Naši rezultati ne ukazuju da je ECP kriterij za razlikovanje pacijenata sa astmom od onih sa NSRD-om, te da njegova koncentracija nije povezana sa razinom IgE i apsolutnim brojem eozinofila u obje grupe ispitanika.

e-pošta: anita.klasic@gmail.com

P09-2

Eosinophil Cationic Protein (ECP), IgE and eosinophils in asthmatic children

Klasić A¹, Beljan B², Kozić-Dokmanović S³, Oršolić Lj⁴, Bukovec Megla Ž⁵, Getaldić B⁶

¹Special Hospital for Medical Rehabilitation Krapinske Toplice, Krapinske Toplice, Croatia

²Rijeka Clinical Hospital Center, Rijeka, Croatia

³University Hospital for Infection Diseases Fran Mihaljević, Zagreb, Croatia

⁴Slavonski Brod General Hospital, Slavonski Brod, Croatia

⁵Laboratory for Endocrinology, Sestre milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

⁶University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Background: Eosinophil cationic protein is a basic protein located in eosinophil matrix. During variety of inflammatory conditions, including asthma, ECP is released through the degranulation process and can be determined in blood. ECP level is proportional to the intensity of allergic inflammatory process. IgE is a marker of atopy in the serum of asthmatics.

Aims of this research were: to compare the serum ECP concentration in asthmatic patients and in the patients with non-specific respiratory diseases (NSRD) with total eosinophil count in peripheral blood and with IgE level in serum, and to compare those parameters within both groups.

Materials and methods: Quantitative measurement of ECP and IgE in serum was performed with an automated commercial FEIA method (ImmunoCAP100,Sweden) in the group of 42 asthmatic children and in 45 children with NSRD. In blood specimens eosinophils were counted on Abbott CD 3200.

Results: We found higher concentrations of all three parameters in asthmatic children than in NSRD diagnosis but difference was not significant ($P > 0.05$). In the group of asthmatic patients concentrations of ECP and IgE showed weak to acceptable correlation ($r = 0.384$; $P = 0.012$), until the ECP concentration and eosinophil count showed moderate correlation ($r = 0.522$; $P < 0.01$). No correlation was found between concentrations of ECP and IgE ($r = 0.025$; $P = 0.87$) nor between eosinophil count and ECP ($r = 0.06$; $P = 0.68$) in the group with NSRD.

Conclusion: Our results do not suggest that ECP is criterion for distinction among patients with asthma and NSRD and ECP level is not associated with IgE level and total eosinophil count in both groups.

e-mail: anita.klasic@gmail.com

P09-3

Značaj imunotesta s mikrokuglicama obilježenim fluorescentnim bojama u detekciji autoantitijela protiv nuklearnih antigena (ANA)

Kozmar A, Škaričić A, Rnjak L, Rudolf M, Radić N, Malenica B

Zavod za imunologiju, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: Antinuklearna autoantitijela (ANA-ENA) usmjerena protiv različitih jezgrinih autoantigena karakteriziraju sistemske reumatske bolesti. Neka od njih služe u klasifikaciji sistemskog eritematoznog lupusa (SLE), mještane bolesti vezivog tkiva (MCTD), sistemske skleroze (ScS) i Sjogrenovog sindroma (SS). Zbog ključne uloge ANA u dijagnozi sistemskih reumatskih bolesti, vrlo ih je važno precizno detektirati. Indirektna imunofluorescencija (IIF) na HEp-2 stanicama, ELISA i imuni test s polistirenskim mikrokuglicama obilježenim s fluorescentnim bojama se koriste za pouzdanu detekciju ANA.

Materijali i metode: Cilj ove studije je usporedba osjetljivosti i podudarnosti tih metoda za detekciju ANA-ENA autoantitijela i njihovih ciljnih autoantigena (SS-A, SS-B, Sm, RNP, DNA topo I, ds-DNA, centromere B, Jo-1 i histoni) u 42 bolesnika sa SLE i 164 bolesnika sa sumnjom na sistemske autoimune bolesti.

Rezultati: Usporedba detekcije ANA sa metodom IIF (HEp-2), s ELISA i fluorescentnim testom baziranim na polistirenskim kuglicama (AtheNa-Multi-Lyte ANA test sistem) pokazala je visoku razinu podudarnosti (Kappa vrijednost od 0,289-0,793 i podudarnost od 88-99%). Nepodudarni pozitivni rezultati nađeni su za ds-DNA u 12,5% (25/200) uzoraka AtheNa tehnologijom, dok su svi ti serumi bili negativni za to antitijelo ELISA metodom. Negativni nepodudarni rezultati nađeni su AtheNa testom za anti-ds-DNA (1,5%; 3/200). U 7 uzoraka seruma (3,5%; 7/200) nađeni su potpuno različiti ciljni antigeni ELISA metodom (ds-DNA) i AtheNa tehnologijom (SS-A, RNP ili SS-A, SS-B). Vrlo dobra podudarnost u detekciji individualnih ciljnih autoantigena opažena je između ELISA i AtheNa-ANA testa (kappa vrijednost od 0,306-0,782 i podudarnost od 90-98%).

Zaključak: Naši rezultati pokazuju da AtheNa Multi-Lyte ANA test sistem može biti korisno dijagnostičko sredstvo za određivanje ANA-ENA.

e-pošta: akozmar@kbc-zagreb.hr

P09-3

Evaluation of multiplexed fluorescent microspheres immunoassay for detection of autoantibodies to nuclear antigens

Kozmar A, Škaričić A, Rnjak L, Rudolf M, Radić N, Malenica B

Department of Immunology, Institute for Laboratory Diagnosis, Zagreb Clinical Hospital Center, Zagreb, Croatia

Introduction: Anti-nuclear autoantibodies (ANA-ENA) directed against various cell nuclear autoantigens characterize systemic rheumatic diseases. Some of them have assigned in the classification for systemic lupus erythematosus (SLE), mixed connective tissue disease (MCTD), systemic sclerosis (ScS) and Sjogren syndrome (SS). Because ANA testing is a critical part of diagnosis in systemic rheumatic diseases, it is important to detect them very carefully. Indirect immunofluorescences (IIF) on HEp-2 cells, ELISA and polystyrene microsphere-based fluorescent assay have been used for this purpose.

Materials and methods: The aim of our study was to compare sensitivity and concordance of these tests for detection of ANA-ENA and determination of nine different target autoantigens in 42 patients with SLE and 164 patients with suspicious systemic autoimmune diseases.

Results: Comparison of ANA screening results by IIF with ELISA and AtheNa Multi-Lyte ANA test system, showed a high rate of concordance (Kappa value from 0.289-0.793 and agreement from 88-89%). Positive discrepant results were found for ds-DNA specificity in 12.5% (25/200) specimens by AtheNa technology, while all tested sera were negative for this antibody by ELISA. Negative discrepant results were observed by AtheNa system for anti-ds-DNA (1.5%; 3/200). In 7 serum samples (3.5%; 7/200) we found completely different target antigens by ELISA (ds-DNA) and by AtheNa technology (SS-A, RNP or SS-A, SS-B). Very good concordance in the detection of individual target autoantigens was observed between ELISA and microsphere-based assay (Kappa value from 0.306-0.708 and agreement from 90-98%).

Conclusion: Our results suggest that the AtheNa Multi-Lyte ANA test system may be a useful diagnostic tool for ANA-ENA determination.

e-mail: akozmar@kbc-zagreb.hr

P09-4

Antitijela na Golgi-jevo tjelešće: Rani znak autoimune bolesti: Prikaz slučaja

Pavela J, Dobrošević B, Fijačko M, Majetić-Cetina N

Odjel za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Klinička bolnica Osijek, Osijek

Uvod: Antitijela na Golgi-jevo (AGA) tjelešće su antitijela prisutna u citoplazmi stanice koja se rijetko uočavaju tijekom rutinske analize. Pojava AGA antitijela se obično veže za bolesti kao što su SLE i Sjogrenov sindrom iako neki izvještaji uočavaju prisutnost AGA antitijela i u reumatskom artritisu i kod HIV oboljelih pacijenata.

Prikaz slučaja: Pacijentica (52 god.) sa simptomima jutarnje ukočenosti i simetričnim poliartritisom tijekom posljednjih 15 godina. Laboratorijski nalazi pokazuju slijedeće: ANA (antinuklearna antitijela) = negativan; RF (reuma faktor) = negativan; CCP (citrulinska antitijela) = 24,8 IU/mL (referentna vrijednost < 25 IU/mL); CRP (C-reaktivni protein) = 8,2 mg/L; ANF (antinuklearni fluorescentni test) = pozitivan. Na Hep-2 stanicama uočena je prisutnost perinuklearne fluorescencije što upućuje na prisutnost AGA. Titar je 1:3200. Godinu kasnije titar AGA je isti a dolazi do porasta titra CCP-a. CCP = 46,4 IU/mL. Dijagnoza je Polyarthritis rheumatoides.

Materijal i metode: AGA su određivane indirektnim imunofluorescentnim testom (IIFT) na Hep-2 stanicama, proizvođač Euroimmun. CCP je određivan ELISA testom, proizvođač Imunoscan.

Zaključak: Unatoč tome što je pojava antitijela na Golgi-jevo tjelešće rijetka i može predstavljati prolazni fenomen kod pacijenata sa virusnom infekcijom, njihova prisutnost u visokom titru a u odsutnosti jasne kliničke slike može upućivati na rani znak autoimune bolesti.

e-pošta: pavela.jasna@kbo.hr

P09-5

CD20+ T Non-Hodgkin limfom; Prikaz slučaja

Šiftar Z¹, Kardum Paro MM¹, Kardum-Skelin I², Dominis M³, Sokolić I¹, Flegar-Meštrić Z¹

¹Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

²Laboratorij za citologiju i hematologiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

³Zavod za kliničku patologiju i citologiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

Uvod: T-Ne Hodgkin limfomi (T-NHL) su dio limfoproliferativnih bolesti s incidencijom manjom od 15%, u kojih se vrlo rijetko opisuje pozitivnost biljega CD20. Imunofeno-

P09-4

Anti-Golgi antibodies: an early sign of autoimmune disease: Case report

Pavela J, Dobrošević B, Fijačko M, Majetić-Cetina N

Institute for Clinical Laboratory Diagnostics, Osijek University Hospital, Osijek, Croatia

Introduction: Anti-Golgi antibodies (AGAs) are a type of anticytoplasmic autoantibody rarely found during routine examination of pathological samples. Although AGAs are primarily associated with Systemic lupus erythematosus and Sjogren syndrome several reports described AGAs in rheumatoid arthritis and HIV infection.

Case report: A 52 years old woman presented with morning stiffness with symmetrical inflammatory polyarthritis involving PIP of 15 years duration. Laboratory findings show: ANA test = negative; RF = negative; CCP = 24.8 IU/mL (reference value < 25 IU/mL); CRP = 8.2 mg/L; Antinuclear fluorescence test = positive, showed distinct perinuclear crescent shaped structure in Hep-2 cells AGAs antibodies. The titer was 1:3200. One year later laboratory findings were similar except rise CCP = 46.4 IU/mL. CCP. The diagnosis is Polyarthritis rheumatoides.

Materials and methods: Anti-Golgi antibodies were detected by indirect immunofluorescence test (IIFT) utilizes Hep-2 cell lines purchased from Euroimmun. Cyclic citrullinated peptide (CCP) antibodies were detected by ELISA test manufactured by IMUNOSCAN.

Conclusion: Although the detection of anti-Golgi antibodies is rare, and may represent a transitory epiphenomenon on patients with a viral infection, their presence in high titre in the absence of a clear clinical picture may constitute an early sign of systemic autoimmune disease.

e-mail: pavela.jasna@kbo.hr

P09-5

CD20+ T Non-Hodgkin lymphoma; Case report

Šiftar Z¹, Kardum Paro MM¹, Kardum-Skelin I², Dominis M³, Sokolić I¹, Flegar-Meštrić Z¹

¹Institute of Clinical Chemistry, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

²Laboratory for Cytology and Haematology, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

³Institute for Clinical Pathology and Cytology, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

Introduction: T Non-Hodgkin lymphoma (T-NHL) is part of lymphoproliferative disease with appearance less than 15%, in which is very rarely described positivism of CD20

tipizacija stanica metodom protočne citometrije je neohodna za njegovo nedvosmisleno dokazivanje.

Materijal i metode: Muškarac, od 67 godina, s uvećanim čvorovima vrata, normalnog broja leukocita, trombocita i eritrocita, povišene sedimentacije eritrocita, zaprimljen je na Hematološki odjel Kliničke bolnice „Merkur“ poradi primanja terapije po shemi FED i proširenjem dijagnostike promjena u limfnom čvoru na molekularnu analizu klonalnosti stanica i imunofenotipizaciju stanica protočnom citometrijom. Morfološka analiza je urađena bojenjem po Pappenheim-u (MGG), a imunocitokemija postupkom alkalna fosfataza-anti alkalna fosfataza (APAAP) na staklu. Molekularna dijagnostika klonalnosti stanica je urađena po van Dongenu (Leukemia, 2003) multiplex PCR postupkom. Imunofenotipizacija stanica je urađena metodom protočne citometrije prema Rothe i sur. (Leukemia, 1996). Analiza je provedena na izoliranim mononuklearnim stanicama preko gradijenta gustoće, nakon obilježavanja direktno obilježenim protutijelima za protočnu citometriju firme Beckman-Coulter i Dako. Rezultati mjerenja su bili u suglasju i unutar ciljnih vrijednosti unutarnje i vanjske kontrole kvalitete UKNEQAS Leukaemia Immunophenotyping.

Rezultati: Citološki nalaz punktata limfnog čvora govori o monomorfnoj populaciji limfatičnih stanica, koje su CD20+ (72%) i CD3+ (59%), patohistološki nalaz: CD20-CD3+/-CD2+CD4+. Molekularnom dijagnostikom je dokazana klonalnost TCRb i TCRg, uz poliklonalan nalaz IgH. Fenotip stanica metodom protočne citometrije je bio: CD2+ (99,6), CD3+ (96,9), CD5+ (97,5), CD4+ (96,9) s pozitivnim CD20 na T limfocitima (CD3+CD20+ od 88,0%).

Zaključak: Rezultati nađenog fenotipa primijenjenih morfoloških dijagnostika su kontradiktorni, za razliku od protočne citometrije koja jedino može sa sigurnošću dokazati neuobičajeno prisustvo biljega jedne loze na stanicama druge loze.

e-pošta: zoran.siftar@hdmh.hr

P09-6

Protutijela na ciklički citrulinski protein i reumatoidni faktor u bolesnika s kroničnom bubrežnom insuficijencijom na hemodijalizi

Romić Ž, Unić A, Đerek L, Živković M, Marijančević D, Serdar T

Klinička bolnica Dubrava, Zagreb

Uvod: Hemodijaliza kao postupak liječenja kronične bubrežne insuficijencije (ESRD) eliminira popratne smetnje, ali istovremeno dovodi do razvoja novih. Reumatoidni artritis (RA) je autoimuna bolest koja uzrokuje kroničnu

marker. Imunofenotiping of cells using flow cytometry is necessary for his undoubtedly proving.

Material and methods: A 67 years old man, with an enlarged neck lymph nodes, the normal number of leukocytes, platelets and erythrocytes, and elevated sedimentation erythrocytes rate, was received at the haematological department "Merkur" University Hospital, for treating by FED scheme and extending diagnosis of changes in lymph node on the molecular analysis of cells clonality and flow cytometry immunophenotyping. Morphological analysis was done according to Pappenheim (MGG staining), and immunocytochemistry procedures alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase (APAAP) staining. Molecular diagnostics of cells clonality was made by Van Dogen (Leukemia, 2003) using multiplex PCR method. Immunophenotyping is made by using flow cytometry according to Rothe et al. (Leukemia, 1996). The analysis was conducted on isolated mononuclear cells through density gradient, after stained with directly conjugated antibodies from Beckman-Coulter and Dako. Measurement results were in accordance and within the target value of internal and external quality assurance programme UKNEQAS Leukaemia Immunophenotyping.

Results: Cytological finding of lymph node aspirates speaks about monomorphous population of lymphatic cells that are CD20+ (72%) and CD3+ (59%), pathological findings are: CD20-CD3+/-CD2+CD4+. Molecular diagnostics proved clonally TCRb and TCRg gene arrangement with polyclonal IgH finding. Cell phenotype using flow cytometry was: CD2+ (99.6), CD3+ (96.9), CD5+ (97.5), CD4+ (96.9) with positive CD20 on T lymphocytes (CD3+CD20+ from 88.0%).

Conclusion: Found phenotype results of applied morphological diagnostics are contradictory, unlike flow cytometry, which alone can prove with certainty the presence of unusual marker from one lineage at the others.

e-mail: zoran.siftar@hdmh.hr

P09-6

Anti-citrullinated protein antibody and rheumatoid factor in patients with end-stage renal disease on hemodialysis

Romić Ž, Unić A, Đerek L, Živković M, Marijančević D, Serdar T

Dubrava University hospital, Zagreb, Croatia

Introduction: Hemodialysis as a treatment for end-stage renal disease (ESRD) may eliminate some concurrent disorders, but it leads to the development of new ones. Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disorder

upalu zglobova i pogađa 1% odrasle populacije. Bolesnici s ESRD na terapiji hemodijalizom mogli bi imati povećanu incidenciju razvoja RA zbog smanjenog staničnog i humoralnog imuniteta.

Cilj: Cilj rada bilo je ispitati umanjuju li ESRD i hemodijaliza, kao i njeno trajanje, vrijednost određivanja protutijela na ciklički citrulinirani protein (anti-CCP) kao ranog prediktivnog biljega, i reumatoidnog faktora (RF) kao jedinog laboratorijskog kriterija za dijagnosticiranje RA.

Materijali i metode: U istraživanje je uključeno: 37 zdravih dobrovoljaca (dob: 50 ± 7 godina) i 57 bolesnika s ESRD (dob: 54 ± 13 godina), liječenih hemodijalizom od 1 do 12 godina. Hemodijalizirana skupina podijeljena je na dvije podskupine ovisno o duljini liječenja (N1: od 1-5 godina; N2: više od 5 godina). Anti-CCP određivan je metodom MEIA na analizatoru Abbott AxSym (IL, USA). RF je određivan imunoturbidimetrijski na analizatoru Olympus AU2700 (Tokyo, Japan). Kolmogorov-Smirnov test korišten je za testiranje normalnosti razdiobe, a Chi kvadrat test i jednosmjerna analiza varijance za usporedbu podataka, pri čemu se $P < 0,05$ smatrao statistički značajnim. Za statističku obradu korišten je program MedCalc9.2.0.0 (MedCalc, Mariakerke, Belgium).

Rezultati: Jednosmjernom analizom varijance nije nađena statistički značajna razlika u vrijednostima anti-CCP-a ($P = 0,11$) i RF-a ($P = 0,98$) među ispitivanim skupinama, a dobivene srednje vrijednosti bile su unutar referentnih vrijednosti (anti-CCP < 3 U/mL; RF < 14 IU/mL).

Zaključak: Dobiveni rezultati indiciraju da ESRD te postupak hemodijalize, kao i njezino trajanje, ne umanjuju vrijednost određivanja anti-CCP-a ni RF-a kao laboratorijskih alata u dijagnostici, te da postupak hemodijalize vjerojatno nije okidač razvoja RA.

e-pošta: adrianaunic@gmail.com

P09-7

Anti-CCP – dijagnostički biljeg reumatoidnog artritisa

Krajnović-Tomašić V, Pipić-Kitter A

Opća bolnica Dr. Josip Benčević, Slavonski Brod

Uvod: RA je kronična autoimuna bolest kod koje dolazi do progresivnog oštećenja zglobova. Najčešće napada male zglobove ruku i nogu. Teško ga se razlikuje od drugih oblika artritisa, a rana dijagnoza je važna zbog uvođenja odgovarajuće terapije kako bi se smanjilo ireverzibilno oštećenje zglobova. Osim RF (reuma faktora) kao biljega reumatoidnog artritisa koji može biti pozitivan (RF

which causes chronic joint inflammations, and affects 1% of the adult population. Patients with ESRD on hemodialysis are at increased risk of developing this condition, as they have defective immunity.

Aim: To examine whether ESRD as well as the procedure and the length of hemodialysis impair the importance of determining anti-CCP, as an early predictive marker, and RF as the only laboratory criteria for RA.

Materials and methods: Study included: 37 healthy volunteers (age: 50 ± 7 years) and 57 ESRD patients (age: 54 ± 13 years) who had been undergoing hemodialysis from 1-12 years. Hemodialysed patients were divided into two groups depending on the length of hemodialysis (N1: 1-5 years; N2: > 5 years). Anti-CCP was determined using the MEIA on Abbott AxSym (IL, USA). RF was determined by immunoturbidimetry on Olympus AU2700 (Tokyo, Japan). Kolmogorov-Smirnov test was used to test normal distribution. Chi square test and ANOVA were used for data comparison, $P < 0.05$ was considered statistically significant. MedCalc9.2.0.0 (MedCalc, Mariakerke, Belgium) has been used for statistical analysis.

Results: ANOVA has not shown significant difference in the values of anti-CCP ($P = 0.11$) and RF ($P = 0.98$) among the investigated groups. The values were within the reference range (anti-CCP < 3 U/mL; RF < 14 IU/mL).

Conclusions: Our results indicate that ESRD and HD, as well as the length of the procedure, do not impair the values of anti-CCP nor RF, and that hemodialysis is not likely the trigger of RA development.

e-mail: adrianaunic@gmail.com

P09-7

Anti-CCP – diagnostic marker for rheumatoid arthritis

Krajnović-Tomašić V, Pipić-Kitter A

Dr. Josip Benčević General Hospital, Slavonski Brod, Croatia

Introduction: RA is a chronic autoimmune disease, with progressive damage of joints. RA often affects the small joints of hands and feet. It is difficult to distinguish it from other forms of arthritis. Early diagnosis is very important because of introducing effective therapy which will minimize irreversible damage of joints. RF (rheuma factor) is the marker for rheumatoid arthritis, which can be positive

seropozitivni RA) ali i negativan, danas se sve više koristi određivanje anti-CCP-a. Anti-CCP su protutijela na citrulin (aminokiselinu nastalu posttranslacijskom modifikacijom argininskih ostataka uz enzim peptidil arginin deiminazu). Brojne studije su potvrdile veliku dijagnostičku vrijednost anti-CCP-a zbog velike osjetljivosti (60-80%) i specifičnosti (98%) za RA. Također je ustanovljeno da anti-CCP mogu biti povišena i do 10-ak godina prije manifestacije RA.

Materijali i metode: Testiranje je vršeno anti-CCP testom tvrtke Abbott na AxSYM analizatoru, MEIA tehnologijom. Napravili smo raspodjelu dobivenih rezultata anti-CCP-a i uputnih dijagnoza da bi vidjeli u kojoj mjeri se slažu dobiveni rezultati s dijagnozama.

Rezultati: Za seropozitivni RA smo u većini slučajeva dobili vrlo visoke vrijednosti anti-CCP-a, dok su kod ostalih oblika artritisa vrijednosti uglavnom bile niže - do normalne uz pojedinačne iznimke (pacijenti možda još nisu do kraja klinički obrađeni).

Zaključak: Visoke vrijednosti anti-CCP-a su svakako pomoć kliničarima pri obradi nediferenciranog poliartritisa jer upozoravaju na mogućnost da se radi o RA.

e-pošta: vera.krajnovic@vip.hr

(seropositive RA), but it can also be negative, because of that today anti-CCP is the marker of choice. Anti-CCP are the antibodies against citruline (amino acid generated by posttranslational modification of arginine residues by the enzyme peptidyl arginine deiminase). Multiple studies showed great diagnostic value of anti-CCP because of its great sensitivity (60-80%) and specificity (98%) for RA. The studies also showed that anti-CCP can be elevated up to 10 years before manifestation of RA.

Materials and methods: Testing was performed with anti-CCP test from Abbott on AxSYM analyzer with MEIA technology. We classified our results for anti-CCP with diagnosis to see in which proportion are the results in agreement with these diagnosis.

Results: For seropositive RA in most cases the results for anti-CCP were very high, in other cases of arthritis the results were lower or normal, with some exceptions (the patients who were not fully clinically examined).

Conclusion: Higher results for anti-CCP are of great help for physicians evaluating indistinguishing polyarthritis because they can predict the possibility of RA.

e-mail: vera.krajnovic@vip.hr

P09-8

Pregled najčešće traženih i najčešće pozitivnih alergena za područje grada Karlovca i okolice

Vrdoljak Gudasić J, Bokulić A, Džaja N, Vrane V

Odjel za laboratorijsku dijagnostiku, Opća bolnica Karlovac, Karlovac

Uvod: Ova studija je osmišljena s ciljem određivanja serumskog specifičnog imunoglobulina E (IgE) na najučestalije alergene u pacijenata upućenih u Odjel za laboratorijsku dijagnostiku Opće bolnice Karlovac.

Materijali i metode: U ispitivanje je obuhvaćeno 223 uzoraka pacijenata upućenih u naš laboratorij tijekom 6 mjeseci. Serumске koncentracije IgE-a na Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae, Ambrosia elatior (ambrozija), Dactylis glomerata (pasji zub), Corylus avellana (lijeska), dlaku mačke i dlaku psa određivane su koristeći ImmunoCAP tehnologiju (UniCAP). Vrijednosti < 0,35 kU/L smatrane su negativnim rezultatom testa, dok su vrijednosti > 0,35 kU/L smatrane pozitivnim.

Rezultati: Od ukupnog broja pacijenata 54,7% su žene, a 45,3% muškarci. Također, 64,6% pacijenata su odrasle osobe, a 35,4% djeca mlađa od 18. Najčešće traženi alergeni su: D. pteronyssinus (80,7%), D. farinae (71,2%), am-

P09-8

The most frequently requested and the most frequently positive allergens in Karlovac region

Vrdoljak Gudasić J, Bokulić A, Džaja N, Vrane V

Department of Laboratory Diagnostics, Karlovac General Hospital, Karlovac, Croatia

Background: This study was designed to determine the specific immunoglobulin E (IgE) to the most common allergens in samples routinely received by the Department of Laboratory Diagnostics in General Hospital Karlovac.

Materials and methods: During a six-month period, 223 samples were examined. Serum concentrations of IgE for Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae, Ambrosia elatior (common ragweed), Dactylis glomerata (cocksfoot), Corylus avellana (hazel), cat dander and dog dander were measured by ImmunoCAP technology (UniCAP). Results of < 0.35 kU/L were considered to be of a negative value and results of > 0.35 kU/L a positive value.

Results: From the total number of patients, 54.7% were women and 45.3% men. Also, 64.6% were adults and 35.4% were children under 18 years. The most requested allergens are: D. pteronyssinus (80.7%), D. farinae (71.2%), am-

brozija (36,3%), lijeska (29,1%), dlaka mačke (27,8%), pasji zub (26,5%) i dlaka psa (26,0%). Učestalost pozitivnih slgE rezultata za ispitivane alergene su slijedom: D. farinae (40,0%), D. pteronyssinus (39,8%), pasji zub (32,2%), ambrozija (32,1%), lijeska (24,6%), dlaka psa (15,5%) i dlaka mačke (14,5%).

Zaključak: Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti da su najtraženije pretrage slgE za Dermatophagoides pteronyssinus i Dermatophagoides farinae. Ujedno su to i pretrage s najvećim brojem pozitivnih rezultata za specifični IgE. Da bi pregled najčešće traženih i najčešće pozitivnih alergena bio vjerodostojniji u karlovačkoj regiji, potrebno je obraditi veći broj pacijenata kroz duži vremenski period čime bi se uključio utjecaj raspodjele alergena tijekom godine.

e-pošta: adriana.bokulic@gmail.com

common ragweed (36.3%), hazel (29.1%), cat dander (27.8%), cocksfoot (26.5%) and dog dander (26.0%). The prevalence of positive results is: D. farinae (40.0%), D. pteronyssinus (39.8%), cocksfoot (32.2%), common ragweed (32.1%), hazel (24.6%), dog dander (15.5%) and cat dander (14.5%).

Conclusions: On the basis of this study, it can be concluded that the most frequently requested allergens are D. pteronyssinus and D. farinae. At the same time, D. pteronyssinus and D. farinae are tests with the highest number of positive results. For the overview of the most frequently requested and the most frequently positive allergens to be more reliable, study should include more patients over longer period of time. That way we could include influence of allergens distribution during a year in Karlovac region.

e-mail: adriana.bokulic@gmail.com

P10 – Onkologija i tumorski biljezi

P10-1 (Usmeno priopćenje)

Povezanost citosolnih koncentracije katepsina D i stope preživljenja bolesnica s primarnim rakom dojke

Jelisavac Ćosić S, Kulić A, Kovač Z, Vrbanc D, Sirotković-Skerlev M, Jakić-Razumović J

Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: Katepsin D je lizosomalna aspartat proteaza pojačano izražena u malignom tkivu. Na stanice tumora i strome katepsin D djeluje mitogeno i tako pospješuje invazivnu i metastatsku funkciju tih stanica. Cilj istraživanja je bio utvrditi povezanost koncentracija katepsina D sa stopom preživljenja bolesnica s primarnim rakom dojke. Prognostička značajnost katepsina D je bila dokazana u studiji s 2810 bolesnica ($P < 0,0001$, $HR = 1,5$). U studiji s 276 bolesnica značajnost je bila prisutna u skupini bolesnica koje nisu primile adjuvantnu terapiju ($N = 119$, $P = 0,001$, $RR = 4,0$), a u skupini koja je primila adjuvantnu terapiju nije bilo značajnosti ($N = 52$, $P > 0,05$, $RR = 1,2$).

Materijali i metode: U citosolima tkiva tumora 253 bolesnice oboljele od primarnog raka dojke izmjerene su koncentracije katepsina D RIA metodom. Prikupljeni su kliničko-patološki i demografski podatci. Liječnici su bili upoznati s nalazima katepsina D. Podatci o preživljenju su dobiveni od Registra za rak RH. U svrhu utvrđivanja povezanosti koncentracija katepsina D i stope preživljenja bolesnica s primarnim rakom dojke izračunate su univarijatna analiza i razlika Kaplan-Meierovih krivulja. Granična vrijednost je bila 45 pmol/mg proteina.

P10 – Oncology and tumor markers

P10-1 (Oral presentation)

Breast cancer cathepsin D expression and survival of patients

Jelisavac Ćosić S, Kulić A, Kovač Z, Vrbanc D, Sirotković-Skerlev M, Jakić-Razumović J

Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Background: Cathepsin D is lysosomal aspartic protease upregulated in malignant tissue. Its activity is mitogenic on cancer cells and stromal cells and it may promote metastatic and invasive properties of both types of cells. The aim of this investigation was to correlate survival rate of primary breast cancer patients and cathepsin D antigen levels. It was significant prognostic marker in study with 2810 patients ($P < 0.0001$, $HR = 1.5$). In study with 276 patients it was significant for patients who received no adjuvant therapy ($N = 119$, $P = 0.001$, $RR = 4.0$), contrary to group who received adjuvant therapy ($N = 52$, $P > 0.05$, $RR = 1.2$).

Materials and methods: Cathepsin D was determined by RIA in tumor tissue cytosols of 253 patients. Conventional clinicopathological and demographic parameters were gathered. The physicians were aware of cathepsin D lab report. Survival follow-up data were provided by National cancer registry office. In order to estimate relationship of survival rate and cathepsin D antigen levels, Kaplan-Meier survival curves and univariate analysis were calculated. Cut-off value was 45 pmol/mg protein.

Rezultati: Medijan vremena praćenja bolesti je bio 90 mjeseci. Univarijatna analiza i razlika Kaplan-Meier-ovih krivulja preživljenja za skupine bolesnica s visokim i niskim koncentracijama katepsina D nisu se statistički značajno razlikovale ($P = 0,90$, $HR = 0,97$, (95% CI) = 0,62-1,53). U bolesnica s metastatski negativnim limfnim čvorovima aksile rezultati su slični ($P = 0,69$, $HR = 1,21$, (95% CI) = 0,47-3,13).

Zaključak: U našem istraživanju koncentracije katepsin D nisu bile povezani sa stopom preživljenja što može biti rezultat promjene terapije bolesnicama s visokim koncentracijama katepsina D.

e-pošta: jelisavaccosic.sanda@gmail.com

P10-2

Uspoređivanje ukupnog i kompleksnog PSA kod bolesnika s hiperplazijom prostate

Peran N, Slavica V, Meniga D, Pamuković D, Sladić D, Martić A

Opća bolnica Šibenik, Šibenik

Uvod: PSA je glikoprotein kojeg stvaraju epitelne stanice prostate. U serumu postoje 2 glavne forme: cPSA – kompleksni PSA (60-90% tPSA) i fPSA – slobodni PSA (10-30%). Povećanu razinu tPSA osim u karcinomu prostate nalazimo i u benignim bolestima, što smanjuje njegovu specifičnost. Vrijednost tPSA manje od 4,0 ng/mL su normalne; 4,0-10,0 ng/mL granične, dok vrijednosti iznad 10,0 ng/mL mogu ukazati na karcinom prostate. Karcinom je moguć i kod tPSA 2,5-4,0 ng/mL što smanjuje osjetljivost ovog testa. Neke studije pokazuju da glavni PSA kod pacijenata s karcinomom čini cPSA (85% tPSA) i da njegovo određivanje može povećati specifičnost i osjetljivost u odnosu na tPSA.

Materijali i metode: U ispitivanje je uključeno 146 ispitanika s hiperplazijom prostate, tPSA 2,5-15 ng/mL; 56 ispitanika tPSA 2,5-4,0 ng/mL; 71 ispitanik tPSA 4-10 ng/mL; 19 ispitanika tPSA 10-15,0 ng/mL. tPSA je određivan na Advia Centaur (Siemens) i na AxSYM (Abbott) analizatorima, a cPSA na Advia Centaur-u.

Rezultati: Rezultati su prikazani u obliku Spearmanovih korelacijskih koeficijenata i medijana cPSA/tPSA omjera: $r = 0,772$, cPSA/tPSA omjer = 0,70 u skupini 2,5-4,0 ng/mL; $r = 0,874$, cPSA/tPSA omjer = 0,78 u skupini 4,0-10,0 ng/mL; $r = 0,771$, cPSA/tPSA omjer = 0,83 u skupini 10,0-15,0 ng/mL. Usporedbom tPSA na spomenutim aparatima dobiveni su koeficijenti: $r = 0,8505$ za skupinu 2,5-4,0 ng/mL; $r = 0,936$ za skupinu 4,0-10,0 ng/mL i $r = 0,7901$ za skupinu 10,0-15,0 ng/mL.

Zaključak: Rezultati su pokazali postojanje korelacije cPSA i tPSA u svim koncentracijskim područjima, poseb-

Results: The median follow-up time was 90 months. Univariate analysis and Kaplan-Meier survival curves for groups of patients with high and low cathepsin D antigen levels were not significantly different ($P = 0.90$, $HR = 0.97$, (95% CI) = 0.62-1.53). In node negative group of patients the results were similar ($P = 0.69$, $HR = 1.21$, (95% CI) = 0.47-3.13).

Conclusions: In our study antigen levels of cathepsin D failed to segregate with the breast cancer patients' survival rates what could be due to altered treatment decision for patients with high cathepsin D levels.

e-mail: jelisavaccosic.sanda@gmail.com

P10-2

Comparasion of total and complexer PSA in patients with prostatic hyperplasia

Peran N, Slavica V, Meniga D, Pamuković D, Sladić D, Martić A

Šibenik General hospital, Šibenik, Croatia

Introduction: Prostate Specific Antigen is a glycoprotein produced in the prostate. PSA exist in the blood in two forms: cPSA and fPSA. Increased serum PSA is found in prostate cancer, however it also increases in various benign diseases so tPSA has low specificity. Cases of CaP have been found when PSA was 2.5-4.0 ng/mL which suggest that tPSA has low sensivity. Some studies have shown that majority of tPSA in cancer patients is cPSA (about 85% of tPSA), and have demonstrated that cPSA offers improved specifity and sensitivity over tPSA.

Materials and metods: 146 patients with prostatic hyperplasia and tPSA concentrations 2.5-15 ng/mL were included in the study: 56 had tPSA 2.5-4.0 ng/mL; 71 had tPSA 4.0-10 ng/mL, and 19 had tPSA 10-15 ng/mL. Total PSA was measured with both the Advia Centaur (Siemens) and AxSYM (Abbott) analyzers; cPSA was measured with the Advia Centaur system.

Results: The results were presented using Spearmans correlation coefficients and median cPSA/tPSA ratio: $r = 0.772$ and cPSA/tPSA = 0.70 in group 2.5-4 ng/mL; $r = 0.874$ and cPSA/tPSA = 0.78 in group 4.0-10.0 ng/mL; $r = 0.771$ and cPSA/tPSA = 0.83 in group 10.0-15.0 ng/mL. Comparison of tPSA measured with both analyzers shows a high rate of correlation in all group.

Conclusions: The results have shown the existance of correlation between cPSA and tPSA in all concentration ranges, especially in range 4.0-10.0 ng/mL. The biggest cPSA/tPSA ratio is in the group of 10.0-15.0 ng/mL, where is the

no u skupini od 4,0-10,0 ng/mL. Najveći omjer cPSA/tPSA je nađen u skupini od 10,0-15,0 ng/mL gdje je mogućnost prisustva karcinoma najveća. ADVIA Centaur PSA (Siemens) test pokazuje visoki stupanj korelacije s Total PSA (Abbott) testom u svim koncentracijskim područjima.

e-pošta: nena.peran1@gmail.com

P11 – Toksikologija i TDM

P11-1

Utjecaj ekstrakcije na GC/MS analizu lijekova

Mandić S¹, Nestić M², Mandić D³, Horvat V¹,
Debeljak Ž¹, Majetić-Cetina N¹

¹Odjel za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Klinička bolnica Osijek, Osijek

²Zavod za sudsku medicinu i kriminalistiku Medicinskog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

³Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, Osijek

Uvod: U kliničkoj i forenzičkoj toksikologiji često postoji potreba dokazivanja prisutnosti određenih lijekova. Koncentracije tih lijekova mogu biti različite, od vrlo niskih do vrlo visokih. Priprema uzorka za analizu, u smislu izbora metode ekstrakcije, otapala i uvjeta analize na GC/MS-u uvelike može utjecati na to koji će se lijekovi i u kojim koncentracijama moći odrediti.

Materijali i metode: Tri različita koncentracijska nivoa komercijalne serumske kontrole Abbott Immunoassay MCC (Bio Rad) koja sadrže 23 različita lijeka pripremili smo korištenjem tri najčešće metode ekstrakcije u kliničkoj i forenzičkoj toksikologiji: tekuća-tekuća ekstrakcija pomoću Toxi-Tubes A (Varian), tekuća-tekuća ekstrakcija pomoću Chem Elut (Varian) i ekstrakcija na čvrstom nosaču na Amberlite XAD-2 adsorbensima (Sigma Aldrich). Svi ekstrakti su otopljeni u kloroformu i analizirani na GC/MS (Agilent).

Rezultati: Prikazane metode ekstrakcije pokazale su različite rezultate, kvalitativno i kvantitativno. Najbolje rezultate pri najnižim koncentracijama pokazao je Toxi-Tubes A sistem (dokazano je 18 lijekova). Pri srednjim i visokim koncentracijama najbolje rezultate dao je XAD-2 (dokazano je 22 lijeka), ali samo kod ekstrakcije s 5 mL otapala, dok su kod ekstrakcije s 1 mL otapala najbolje rezultate dali Toxi-Tubes A i Chem Elut sistem (dokazano je 19 lijekova pri srednjim odnosno 20 lijekova pri visokim koncentracijama).

Zaključak: Od prikazanih metoda prividno najbolje rezultate pokazala je metoda ekstrakcije na XAD-2 adsorbensu sa 5 mL otapala, no kada se uzmu u obzir i drugi parametri kao što su utrošeno vrijeme, kemikalije i složenost postupka, najbolje rezultate dala je ekstrakcija sa Toxi-Tubes A sistemom.

e-pošta: mandic.sanja@gmail.com

high occurrence of cancer. ADVIA Centaur PSA (Siemens) shows high rate of correlation in determination of Total PSA with AxSYM (Abbott) in all concentration ranges.

e-mail: nena.peran1@gmail.com

P11 – Toxicology and TDM

P11-1

Influence of extraction on GC/MS analysis of drugs

Mandić S¹, Nestić M², Mandić D³, Horvat V¹,
Debeljak Ž¹, Majetić-Cetina N¹

¹Department for Clinical Laboratory Diagnostics, Osijek University Hospital, Osijek, Croatia

²Department of Forensic Medicine and Criminology, School of Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

³Institute of Public Health of Osijek-Baranya County, Osijek, Croatia

Introduction: In clinical and forensic toxicology there is often need for confirmation of certain types of drugs. Their concentrations can vary, from very low to very high levels. Sample preparation, in terms of choice of extraction technique, solvent and chromatographic conditions of analysis can have great influence (qualitative and quantitative) on results.

Materials and methods: We have prepared three different concentration levels of commercial serum control Abbott Immunoassay MCC (Bio Rad), which comprises 23 different drugs, with three most common extraction techniques in forensic and clinical toxicology: liquid-liquid extraction with Toxi-Tubes A (Varian), liquid-liquid extraction with Chem Elut (Varian) and solid phase extraction on Amberlite XAD-2 (Sigma Aldrich). All extracts were reconstituted in chloroform and analyzed in GC/MS (Agilent).

Results: Those three extraction methods showed different results, both qualitatively and quantitatively. Best results at low concentrations levels showed Toxi-Tubes A system (18 drugs confirmed). At medium and high concentrations levels best results were obtained with XAD-2 (22 drugs confirmed), but only when we used 5 mL of solvent. With 1 mL of solvent, best results were obtained with Toxi-Tubes A and Chem Elut systems (19 drugs at medium and 20 drugs at high concentration levels confirmed).

Conclusion: Best results amongst displayed methods showed XAD-2, but when we take into consideration other parameters such as time consumed, amount of chemicals and complexity of procedure, best results were obtained with TOXI-TUBES A system.

e-mail: mandic.sanja@gmail.com

P12 – Procjena analitičkih sustava

P12-1 (Usmeno priopćenje)

Prednosti određivanja takrolimusa na Abbott Architect analizatoru

Ožvald I¹, Šurina B¹, Flegar-Meštrić Z¹, Vidas Ž²

¹Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

²Klinika za kirurgiju, Centar za transplantaciju organa, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

Uvod: Doživotna imunosupresivna terapija u transplantiranih bolesnika zahtijeva intra- i interindividualno terapijsko titriranje. Niža terapijska doza lijeka smanjuje toksične nuspojave. Preporuka je European Consensus Recommendation from the Committee on Tacrolimus Optimization da se za određivanje takrolimusa treba koristiti specifične metode s funkcionalnom osjetljivošću na razini 1 ug/L.

Materijali i metode: Analitička validacija takrolimusa metodom kemiluminiscentnog određivanja (CMIA) na Abbott Architect analizatoru obuhvaćala je: nepreciznost u seriji na humanom uzorku i na komercijalnim kontrolnim uzorcima (N = 5); nepreciznost iz dana u dan na komercijalnim kontrolnim uzorcima (N = 15); netočnost na komercijalnim kontrolnim uzorcima (N = 15) i usporedno određivanje na humanim uzorcima (N = 20) na IMx analizatoru MEIA metodom i CMIA metodom na Architect analizatoru.

Rezultati: Nepreciznost u seriji na humanom uzorku iznosi 1,69%, dok na komercijalnom kontrolnom uzorku za L1 iznosi 1,24%, za L2 3,61% i za L3 2,38%; nepreciznost iz dana u dan na komercijalnim uzorcima iznosi za L1 4,01%, za L2 4,49% i za L3 3,38%; netočnost na komercijalnim uzorcima za L1 -4,95%, za L2 0,39% i L3 -2,23%. Rezultati su unutar ciljnih dometa proizvođača i iznose za nepreciznost i netočnost ≤ 10%. Linearnost je potvrđena kalibracijskom krivuljom u 6 točaka u rasponu od 0 do 30 ug/L. Preliminarni podaci usporedbe humanih uzoraka (N = 20) u području linearnosti metode pokazuju koeficijent korelacije od 0,957.

Zaključak: CMIA metoda za određivanje takrolimusa na Abbott Architect analizatoru je osjetljiv i precizan test. Metoda ima nisku funkcionalna osjetljivost i eliminaciju interferencija: hematokrita, visokih vrijednosti kolesterola, triglicerida, bilirubina, ukupnih proteina i urata, te je specifičnija u odnosu na druge rutinske metode.

e-pošta: iozvald@gmail.com

P12 – Evaluation of analytical systems

P12-1 (Oral presentation)

Advantage of tacrolimus determination on Abbott Architect analyzer

Ožvald I¹, Šurina B¹, Flegar-Meštrić Z¹, Vidas Ž²

¹Department of clinical chemistry, Merkur University hospital, Zagreb, Croatia

²Surgical Clinic, Department of Organ Transplantation, Merkur University hospital, Zagreb, Croatia

Introduction: Long life immunosuppressive therapy in transplant patients requiring intra- and interindividual therapeutic titrate. Lower therapeutic dose of drug reduces the toxic side effects. European Consensus Recommendation from the Committee on Tacrolimus Optimization recommended for the tacrolimus determination to use method which requires detection of functional sensitivity of 1 µg/L.

Materials and methods: Analytical validation of tacrolimus determination by chemiluminescent immunoassay (CMIA) on Abbott Architect system included: within-run imprecision on the human samples and commercially controls (N = 5); between-day imprecision on commercially controls (N = 15); inaccuracy on commercially controls (N = 15) and comparison determination on the human samples (N = 20) on 2 systems: IMX (MEIA) and Architect (CMIA) methods.

Results: Within-run imprecision on the human sample is 1.69% and on commercially controls for L1 is 1.24%, L2 is 3.61% and L3 is 2.38%; between-day imprecision on commercially controls is 4.01%; 4.49%; 3.38% for L1, L2, L3 respectively; inaccuracy on commercially controls for L1 is -4.95%, L2 is 0.39 and L3 is -2.23%. The results are within the target range of the Architect Tacrolims assay data and they are for imprecision and inaccuracy ≤ 10%. Linearity was confirmed with calibration curve in 6 points in concentration range from 0 to 30 ug/L. Preliminary data of method comparison on human samples (N = 20) show in the range of method linearity correlation coefficient from 0.957.

Conclusion: CMIA method for tacrolimus determination on the Abbott Architect system is sensitive and accurate test. Method has low functional sensitivity and elimination of interferences: hematocrit, high values of cholesterol, triglycerides, bilirubin, total protein and uric acid, what means that this method is more specific in comparison to other routine methods.

e-mail: iozvald@gmail.com

P12-2

Usporedba kolorimetrijske i turbidimetrijske metode za određivanje koncentracije ukupnih proteina u mokraći

Obuljen J¹, Mujagić R², Tešija Kuna A³,
Frakin-Užović I⁴, Svržan J³, Vrkić N³

¹Zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zagreb

²Medicinsko-biokemijski laboratorij, Opća bolnica Pula, Pula

³Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

⁴Odjel za transfuziologiju, Opća bolnica Zadar, Zadar

Uvod: Najčešće upotrebljavane automatizirane metode za određivanje koncentracije ukupnih proteina u mokraći su kolorimetrijske metode temeljene na vezivanju boje (crveni pirogalol) i turbidimetrijske metode temeljene na precipitaciji (benzetonijski klorid) za koje se pokazalo da imaju različitu osjetljivost prema različitim vrstama proteina. Cilj ovog istraživanja je bila analitička usporedba dviju metoda za određivanje koncentracije ukupnih proteina u mokraći te procjena njihovih dijagnostičkih točnosti u otkrivanju albuminurije.

Materijali i metode: U istraživanje je bilo uključeno 57 ispitanika kojima je određena koncentracija ukupnih proteina i albumina u uzorku 24-satne mokraće. Ukupni proteini su određivani na biokemijskom analizatoru Olympus AU 2700 (reagensi Olympus Urinary/CSF Reagent i Roche Diagnostics GmbH Urinary/CSF Protein), kalibracija za obje metode je učinjena istim standardom proteina iz paketa reagensa Olympus Urinary/CSF reagent, a za provjeru točnosti koristili smo komercijalne kontrole Bio-Rad Liquichek Urine Controls u dvije razine. Albumin je određen nefelometrijskom metodom na nefelometru Behring Nephelometer analyzer II.

Rezultati: Nepreciznost iz dana u dan, nepreciznost u seriji i netočnost za metodu s pirogalol-crvenilom iznosili su 3,1%; 2,6% i 9,4%, a za metodu s benzetonijskim kloridom 5,4%; 3,1% i 8,9%. Statistička analiza usporedivosti metoda po Bland i Altman-u pokazala je neslaganje između dviju metoda (prosječni otklon = -43,9%; 95% CI = -57,3 do -30,5 što je posebno izraženo u rasponu nižih koncentracija. Dijagnostička točnost u otkrivanju albuminurije procijenjena je pomoću ROC analize. Dijagnostički kriterij za albuminuriju je bila koncentracija albumina $\geq 0,030$ g/dU. Za kolorimetrijsku metodu površina ispod krivulje (AUC) iznosila je 0,867 (95% CI = 0,751-0,942) uz izračunatu optimalnu graničnu vrijednost 0,131 g/dU, a za turbidimetrijsku metodu AUC = 0,920 (95% CI = 0,817-0,975) uz izračunatu optimalnu graničnu vrijednost 0,069 g/dU. Usporedbom površina ispod krivulje nije dobivena statistički značajna razlika između ispitivanih metoda.

P12-2

Comparison of colorimetric and turbidimetric method for total protein determination in urine

Obuljen J¹, Mujagić R², Tešija Kuna A³,
Frakin-Užović I⁴, Svržan J³, Vrkić N³

¹Department of Laboratory Diagnostics, Zagreb Children's Hospital, Zagreb, Croatia

²Medical Biochemistry Laboratory, Pula General Hospital, Pula, Croatia

³University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

⁴Department of Transfusiology, Zadar General Hospital, Zadar, Croatia

Background: The most frequently used automated methods for quantitative determination of total urinary proteins are colorimetric, dye binding methods (pyrogallol red) and turbidimetric, precipitation methods (benzethonium-chloride) which exhibit different sensitivities to various proteins. The aim of this study was analytical comparison of two methods for urine protein determination and evaluation of their diagnostic accuracy for determination of albuminuria.

Materials and methods: We examined 55 participants and determined total protein and albumin concentration in 24-hour urine collection. Total urine protein assays were performed on biochemical analyzer Olympus 2700 (reagents Olympus Urinary/CSF Reagent and Roche Diagnostics GmbH Urinary/CSF Protein), we calibrated both tests with the same protein standard from Olympus kit, commercial controls Bio-Rad Liquichek Urine Controls at two levels were used for inaccuracy control. Albumin was determined by nephelometric method on Behring Nephelometer analyzer II.

Results: Bland and Altman statistical method showed disagreement between two methods (mean amount of disagreement = -43.9%; 95% CI = -57.3 to -30.5) which is specifically expressed in the lower concentration range. Inter-assay imprecision, intra-assay imprecision and inaccuracy for pyrogallol and benzethonium-chloride were: 3.1%, 2.6%, 9.4% and 5.4%, 3.1% and 8.9%, respectively. Receiver operating characteristic (ROC) analysis was used to assess diagnostic accuracy. Decision criteria for albuminuria was albumin concentration ≥ 0.030 g/24h. The area under the ROC curve for colorimetric method was 0.867 (95% CI = 0.751-0.942) with the optimal calculated cut-off value 0.131 g/24 h, and for the turbidimetric AUC = 0.920 (95% CI = 0.817-0.975) with the optimal cut-off value 0.069 g/24h. Comparison of areas under the ROC curve showed no statistically significant difference.

Conclusion: Imprecision and inaccuracy are acceptable for both methods according to the Westgard specification, but quantification of total urine protein was not

Zaključak: Nepreciznost i netočnost za obje metode je prihvatljiva prema Westgard-ovim pravilima, međutim kvantificiranje ukupnih proteina u uzorcima mokraće nije usporedivo, posebno u području nižih koncentracija. Navedene metode su pokazale sličnu dijagnostičku točnost u otkrivanju albuminurije, ali uz različite granične vrijednosti pa se klinička odluka treba temeljiti na optimalnim graničnim vrijednostima za pojedinu metodu.

e-pošta: jasna.obuljen@kdb.hr

P12-3

Analitičko ispitivanje Gem® Premier TM4000 analizatora - komparativna studija

Hrabrić Vlah S, Dvornik Š, Grdović D

Zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka

Cilj: Cilj studije je bio usporediti kvantitativne rezultate na novom Gem® PremierTM4000 kao POCT (engl. *point of care testing*) analizatoru s referentnim analizatorima. Posebna pažnja je posvećena tehnologiji mjerenja koncentracije hemoglobina i hematokrita na POCT analizatorima.

Materijali i metode: Rezultati dobiveni na Gem® PremierTM4000 su bili uspoređivani s Ciba Corning 865, Gem Premier 3000 i Dimenzija RxL analizatorima za pH/pCO₂, pO₂/elektrolite/metabolite i za hemoglobin/hematokrit. Nepreciznost u seriji i nepreciznost iz dana u dan su analizirani na Gem® PremierTM4000 analizatoru. Analizirano je 200 uzoraka pune krvi (arterijska krv) u razdoblju od 30 dana.

Rezultati: Dobiveni su zadovoljavajući rezultati ispitivanja nepreciznosti u seriji kod svih analita ($CV \leq 4,89\%$), osim za pO₂ ($CV = 14,66\%$). Rezultati ispitivanja nepreciznosti iz dana u dan su bili zadovoljavajući ($CV \leq 4,41\%$), osim za laktat (razina I: $CV = 8\%$, razina II: $CV = 6,59\%$). Koeficijenti korelacije usporednih metoda su bili zadovoljavajući za većinu parametara ($r = 0,9458-0,9948$), osim za natrij ($r = 0,8635$). Koeficijenti korelacije za hemoglobin su bili izvrsni, $r = 0,9923$ (Gem® PremierTM4000 vs. Ciba Corning 865) i $r = 0,9759$ (Gem® PremierTM4000 vs. Gem® PremierTM 3000). Regresijska analiza po Passing Babloku pokazuje dobru kompatibilnost između rezultata dobivenih usporedbom ispitivanog analizatora i referentnih analizatora, osim natrija (Gem® PremierTM4000 vs. Ciba Corning 865; $y = 34,7500 + 0,7500x$) i hemoglobina (Gem® PremierTM4000 vs. Gem Premier 3000; $y = 23,6923 + 0,8308x$).

Zaključak: Rezultati dobiveni usporednim mjerenjem analita između ispitivanog i referentnih analizatora su bili kompatibilni. Naši rezultati prikazuju da CO-oximetrija je točnija i pouzdanija metoda određivanja koncentracije hemoglobina u sustavu POCT-a.

e-pošta: snjezana.hrabric.vlah@gmail.com

comparable, specifically at the lower concentration range. The two examined methods showed similar diagnostic accuracy, but with different cut-off values, so clinical decisions should be made according to the optimal cut-off value for the certain method.

e-mail: jasna.obuljen@kdb.hr

P12-3

Analytical performance of the Gem® Premier TM4000 – comparative study

Hrabrić Vlah S, Dvornik Š, Grdović D

Department of laboratory diagnostics, Rijeka Clinical Hospital Centre, Croatia

Objective: The aim of this study was to compare quantitative data on a new point-of-care testing (POCT) Gem® PremierTM4000 analyzer with reference analyzers. Special attention was given to technology of measurement concentration of hemoglobin and hematocrit on the POCT analyzers.

Materials and methods: Analytical performance of the Gem® PremierTM4000 was compared with Ciba Corning 865, Gem Premier 3000 and Dimension RxL analyzers for pH/pCO₂, pO₂/electrolytes/metabolites and for hemoglobin/hematocrit. Within-run and between-run imprecisions have been done for the Gem® PremierTM4000 analyzer. In the period of 30 days, 200 whole blood samples were analyzed.

Results: Satisfactory results were obtained on within-run imprecision for all study analytes ($CV \leq 4.89\%$), except for pO₂ ($CV = 14.66\%$) and on between-run imprecision for all parameters ($CV \leq 4.41\%$), except for lactate (Level I: $CV = 8\%$, Level II: $CV = 6.59\%$). The correlation with the comparative methods was satisfactory, correlation coefficients were between 0.9458-0.9948, for most parameters, except for sodium $r = 0.8635$. For hemoglobin correlation coefficients were excellent, $r = 0.9923$ (Gem® PremierTM4000 vs. Ciba Corning 865) and $r = 0.9759$ (Gem® PremierTM4000 vs. Gem® PremierTM 3000). Passing Bablok regression analysis of analytes concentrations showed good compatibility, except for sodium (Gem® PremierTM4000 vs. Ciba Corning 865; $y = 34.7500 + 0.7500x$) and hemoglobin (Gem® PremierTM4000 vs. Gem Premier 3000; $y = 23.6923 + 0.8308x$).

Conclusions: Results of analyses obtained by the comparative measurement analytes between study and reference analyzers were compatible. Our results present that co-oximetry is the only accurate and reliable method of hemoglobin determination.

e-mail: snjezana.hrabric.vlah@gmail.com

P12-4

Skraćena validacija analizatora Capillarys 2 - Sebia

Matišić D¹, Galez D², Čvorišćec D¹

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

²Odjel za laboratorijsku dijagnostiku, Opća bolnica Karlovac, Karlovac

Uvod: Skraćena validacija analizatora za kapilarnu elektroforezu Capillarys 2 - Sebia, provedena je prema preporukama Europskog odbora za kliničko-laboratorijske standarde (ECCLS).

Materijali i metode: Procjena analitičkih značajki analizatora provedena je određivanjem nepreciznosti u seriji, nepreciznosti iz dana u dan, netočnosti i usporednim određivanjem uzoraka seruma na analizatoru Capillarys 2 Sebia i Olympus HITE 320. Nepreciznost u seriji određena je na 10 uzastopnih mjerenja dva kontrolna seruma tijekom 3 dana. Nepreciznost iz dana u dan određena je mjerenjem koncentracije analita u duplikatu kroz 10 dana u 2 kontrolna seruma. Netočnost je izražena kao postotak odstupanja srednje izmjerene vrijednosti od deklarirane vrijednosti kontrolnih seruma. Usporedna određivanja provedena su pomoću 40 uzoraka seruma.

Rezultati: Nepreciznost u seriji pokazala je koeficijent varijacije < 4,64% za sve frakcije. Nepreciznost iz dana u dan pokazala je koeficijent varijacije < 5,92% za sve frakcije. Rezultati ispitivanja netočnosti pokazali su odstupanje < 8,32% za sve frakcije osim za alfa 2-globuline u Hipergama kontroli gdje je odstupanje bilo 12,60%. Rezultati usporednih ispitivanja pokazali su koeficijent korelacije od 0,8873 do 0,9665 za sve frakcije. Regresijska analiza po Passingu i Babloku pokazala je da nije bilo značajnog odstupanja od linearnosti.

Zaključak: Rezultati skraćene validacije pokazali su da je sustav Capillarys 2 Sebia precizan, točan i pouzdan analizator koji je pokazao visoki stupanj podudarnosti s analizatorom Olympus HITE 320. Potpuna automatizacija, visoki stupanj razlučivosti, velika brzina, visoka osjetljivost i reproducibilnost te mogućnost priključivanja na laboratorijski informacijski sustav značajno su proširili domet primjene samog analizatora te ubrzali i olakšali rutinski rad.

e-pošta: dmatistic@kbc-zagreb.hr

P12-4

Short validation of the Sebia Capillarys 2 analyzer

Matišić D¹, Galez D², Čvorišćec D¹

¹Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of Medicine and Clinical Hospital Center Zagreb, Zagreb, Croatia

²Department of Laboratory Diagnostics, Karlovac General Hospital, Karlovac, Croatia

Introduction: Short validation of the Sebia Capillarys 2 analyzer for capillary electrophoresis was performed according to the guidelines of the European Committee for Laboratory Standards (ECCLS).

Materials and method: Analytical properties of the analyzer were evaluated by determination of within-run imprecision, between-run imprecision, inaccuracy, and comparative determination serum samples on Sebia Capillarys 2 and Olympus HITE 320 analyzers. Within-run imprecision was examined in 10 consecutive measurements of two control sera during 3 days. Between-run imprecision was examined in duplicate in two control sera during 10 days. Inaccuracy was calculated as a percentage of deviation of mean determined value from the mean value declared for control sera. Comparative determinations were made using 40 serum samples.

Results: Within-run imprecision showed coefficients of variation < 4.64% for all fractions. Between-run imprecision showed coefficients of variation < 5.92% for all fractions. Inaccuracy testing showed bias < 8.32% for all fractions except alfa 2-globulin in Hipergamma Control where bias was 12.60%. Results of the comparison showed correlation coefficients to range from 0.8873 to 0.9665 for all fractions. Passing Bablok regression analysis showed that there was no significant deviation from linearity.

Conclusion: Results of the short validation showed the Sebia Capillarys 2 analyzer to be a precise, accurate and reliable instrument with high degree of correlation to Olympus HITE 320 analyzer. Full automatization, high resolution, high speed, high sensitivity and reproducibility and possible connection of the analyzer to laboratory information system have significantly broadened the possibilities for its application, making the routine work faster and easier than before.

e-mail: dmatistic@kbc-zagreb.hr

P12-5

Analitička procjena biokemijskog analizatora Pentra400 tvrtke Horiba ABX

Badža N¹, Jurčić-Karlović E², Doljanin Z³

¹Poliklinika Sunce, Zadar

²Poliklinika Sunce, Rijeka

³Poliklinika Sunce, Split

Cilj: Analitička procjena biokemijskog analizatora Pentra400 tvrtke Horiba ABX, Francuska, prema preporukama ECCLS, određivanjem koncentracije glukoze, kolesterola, kreatinina, ALP, AST, CRP, natrija i kalija reagensima iste tvrtke.

Materijal i metode: Analitička procjena obuhvatila je nepreciznosti u seriji i iz dana u dan, te netočnost. Nepreciznost u seriji određena je višekratnim (10x) mjerenjem komercijalnih kontrolnih uzoraka (N/P) i svježeg humanog seruma, i izražena kao koeficijent varijacije (KV). Nepreciznost iz dana u dan određena je mjerenjem u duplikatu tijekom 15 dana na kontrolnim uzorcima i pool serumu. Netočnost je izračunata kao odstupanje (R%) srednje izmjerene vrijednosti u odnosu na deklariranu vrijednost kontrolnih seruma tijekom provjere nepreciznosti iz dana u dan.

Rezultati: Zadovoljavajući rezultati za nepreciznost u seriji dobiveni su za kreatinin, kolesterol, glukozu, AST, CRP, natrij i kalij. Nešto slabiji rezultati na kontrolnom uzorku P dobiveni su za ALP (KV 4,1%). Zadovoljavajući rezultati za nepreciznost iz dana u dan dobiveni su za glukozu, kolesterol, AST, CRP i kalij. Nešto slabiji rezultati na kontrolnom uzorku P dobiveni su za kreatinin (KV 3,1%) i ALP (KV 4,5%). Za natrij nisu dobiveni zadovoljavajući rezultati nepreciznosti iz dana u dan (KV 1,7% za kontrolu N, KV 1,9% za kontrolu P i KV 1,0% za pool seruma). Odstupanja od deklariranih vrijednosti pokazala su prihvatljiv stupanj točnosti za sve ispitivane analite.

Zaključak: Prikazani rezultati provedene analitičke procjene analizatora Pentra400 tvrtke Horiba ABX za određivanje koncentracije glukoze, kolesterola, kreatinina, ALP, AST, CRP, natrija i kalija pokazuju da se analizator i reagensi mogu koristiti u laboratoriju.

e-pošta: erika.jurcic-karlovic@sunce.hr

P12-5

Analytical evaluation of biochemistry analyzer Pentra400 (Horiba ABX)

Badža N¹, Jurčić-Karlović E², Doljanin Z³

¹Sunce Policlinic, Zadar, Croatia

²Sunce Policlinic, Rijeka, Croatia

³Sunce Policlinic, Split, Croatia

Aim: To estimate analytical performance of biochemistry analyzer Pentra400, Horiba ABX, France, according to the ECCLS protocol by determination of creatinine, cholesterol, glucose, ALP, AST, CRP, sodium and potassium concentrations using reagents of same manufacturer.

Material and methods: Analytical assessment comprised within-run as well as between-run imprecision and inaccuracy. Within-run imprecision was determined by multiple (10x) measurements of commercial control samples (N/P) and human sera, and expressed as a coefficient of variation (CV). Between-run imprecision was determined on N/P control samples and pool sera during 15 days on two replicates. Inaccuracy was expressed as a percentage of bias (R%) of the determined mean value from the declared mean value. Inaccuracy was evaluated using data from between-run imprecision measurement on control samples.

Results: Satisfactory results were achieved for within-run imprecision for creatinine, glucose, cholesterol, AST, CRP, sodium and potassium. Poorer result for the control sample P was obtained for ALP (CV 4.1%). Satisfactory results were achieved for between-run imprecision for glucose, cholesterol, AST, CRP and potassium. Poorer but acceptable results of control sample P were obtained for creatinine (CV 3.1%) and ALP (CV 4.5%). The results of between-run imprecision for sodium were not satisfactory (CV 1.7% for control N; CV 1.9% for control P; CV 1.0% for human sera, respectively). Deviation from declared control sample values showed a satisfactory level of accuracy for all tested parameters.

Conclusion: Results of the study indicate that biochemistry analyzer Pentra400 provides accurate and precise results and is convenient for use in routine laboratory.

e-mail: erika.jurcic-karlovic@sunce.hr

P12-6

Usklađivanje različitih analitičkih sustava u svakodnevnom laboratorijskom radu

Juričić G, Ravnić R, Trogrlić M, Honović L

Medicinsko biokemijski laboratorij, Opća bolnica Pula, Pula

Uvod: U skladu s pravilima dobre laboratorijske prakse i uvođenjem harmonizacije laboratorijskih nalaza, u svakodnevnoj praksi suočavamo se s problemom usklađivanja različitih analitičkih sustava. Cilj rada bio je usporediti izmjerene koncentracije ukupnog i konjugiranog bilirubina koje su određivane različitim modifikacijama metoda s diazo-reagensom na biokemijskim analizatorima Architect c8000 i Olympus AU400, te razmotriti kliničku opravdanost uvođenja jedinstvenih referentnih intervala (Harmonizacija laboratorijskih nalaza iz medicinske biokemije; HKMB, 2004.).

Materijali i metode: Koncentracija ukupnog i konjugiranog bilirubina određena je u 41 uzorku. Usporedba metoda učinjena je statističkim programom MedCalc 9.2.1.0 regresijom po Passing-Bablok-u i Bland-Altman prikazom.

Rezultati: Izmjerene koncentracije ukupnog bilirubina prosječno su 14,6% (95% CI = -19,0 do -10,1) niže na Architectu c8000. Metode za određivanje ukupnog bilirubina na Architectu c8000 i Olympusu AU400 moguće je uskladiti pomoću pripadne jednadžbe pravca regresije po Passing-Bablok-u: $y \text{ (uk.bil.Arch)} = 0,934 \times \text{ (uk.bil.Oly)} - 1,906$. Izmjerene koncentracije konjugiranog bilirubina prosječno su 51,6% (95% CI = 42,4 do 60,9) više na Architectu c8000. Metode za određivanje konjugiranog bilirubina na Architectu c8000 i Olympusu AU400 nije moguće primjereno uskladiti zbog značajnog odstupanja od linearnosti. Analitički otklon izmjerenih koncentracija ukupnog i konjugiranog bilirubina izraženiji je u području nižih koncentracija.

Zaključak: S obzirom na značajna neslaganja između različitih metoda s diazo-reagensom za određivanje konjugiranog bilirubina na dva analitička sustava, upitna je opravdanost uvođenja jedinstvenih referentnih intervala po Harmonizaciji.

e-pošta: gjuricic@gmail.com

P12-6

Harmonization of different analytical systems in everyday laboratory practice

Juričić G, Ravnić R, Trogrlić M, Honović L

Laboratory of Medical biochemistry, Pula General Hospital, Pula, Croatia

Background: In accordance with the rules of good laboratory practice and with the introduction of harmonization of laboratory test results, in everyday practice we face the problem of harmonizing various analytical systems. The aim was to compare the measured concentrations of total and conjugated bilirubin obtained by various modifications of methods with diazo-reagent on biochemical analyzers Architect c8000 and Olympus AU400. Also, we consider the clinical justification of introduction of unique reference interval (Harmonization of laboratory test results in medical biochemistry; CCMB, 2004.).

Materials and methods: Concentration of total and conjugated bilirubin was determined in 41 sample. Comparison of methods was performed with MedCalc 9.2.1.0 statistical software using Passing-Bablok regression and Bland-Altman plot.

Results: Measured concentrations of total bilirubin were on average 14.6% (95% CI = -19.0 to -10.1) lower on Architect c8000. Methods for determination of total bilirubin on Architect c8000 and Olympus AU400 can be harmonized with the direction of Passing-Bablok regression equation: $y \text{ (tot.bil.Arch)} = 0.934 \times \text{ (tot.bil.Oly)} - 1.906$. Measured concentrations of conjugated bilirubin were on average 51.6% (95% CI = 42.4 to 60.9) higher on Architect c8000. Methods for determination of conjugated bilirubin on Architect c8000 and Olympus AU400 can not be properly harmonized because of significant deviation from linearity. Analytical deflection of total and conjugated bilirubin concentrations was more visible in the area of lower concentrations.

Conclusion: Considering significant disagreement between different methods with diazo-reagent for determination of conjugated bilirubin on two analytical systems, the legitimacy of the introduction of unique reference interval by Harmonization is questionable.

e-mail: gjuricic@gmail.com

P12-7

Usporedba metoda za određivanje tumorskih biljega

Salamunić I, Bilopavlović N, Galetović A, Pauković Sekulić B, Tandara L

Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Split, Split

Uvod: Za određivanje tumorskih biljega (TM) u serumu pacijenata koriste se imunokemijski testovi i analitički instrumenti različitih proizvođača. U provedbi validacije imunokemijskih testova usporedba metoda je iznimno značajna. Cilj je bio usporediti vrijednosti pet TM dobivenih dvijema različitim metodama.

Materijali i metode: Analizirani su serum pacijenata s kliničkom sumnjom na malignu bolest ili potvrđenom malignom bolesti. Uspoređivani su rezultati za CEA, CA 19-9, CA 15-3, PSA, i fPSA dobiveni na analizatorima Elecsys 2010 (Roche) i Olympus AU 3000i (Olympus). Na analizatoru Elecsys 2010 TM su se određivali elektrokemiluminiscentnom metodom a na AU 3000i kemiluminiscentnom metodom. Statistička obradba rezultata učinjena je pomoću statističke programske potpore. (MedCalc Software).

Rezultati: Koeficijent korelacije (r) između Elecsys 2010 and AU 3000i za: CEA ($N = 180$, $r = 0.993$), CA 19-9 ($N = 131$, $r = 0.979$), CA 15-3 ($N = 105$, $r = 0.826$), PSA ($N = 148$, $r = 0.986$) i fPSA ($N = 61$, $r = 0.976$). Uvjeti Passing-Bablok regresije nisu zadovoljeni za: CEA (95% CI, $a = -0.701$ do -0.470 ; $b = 0.869$ do 0.948), CA 19-9 (95% CI, $a = 1.533$ do 2.476 ; $b = 0.890$ do 0.970), PSA (95% CI, $b = 0.916$ do 0.966), fPSA (95% CI, $b = 0.735$ do 0.829), a zadovoljeni su za CA 15-3 (95% CI, $a = -1.233$ do 2.327 , $b = 0.867$ do 1.074). Na Bland-Altmanovom prikazu 95% granice podudaranja srednjih razlika bile su: CEA Elecsys-AU3000i (95% CI = -50.4 do 43.2), CA 19-9 Elecsys-AU3000i (95% CI = -111.1 do 87.6), CA 15-3 Elecsys-AU3000i (95% CI = -727 do 817.8), PSA Elecsys-AU3000i (95% CI = -11.1 do 8.9) i fPSA Elecsys-AU3000i (95% CI = -1.13 do 0.49).

Zaključak: Rezultati određivanja TM sa dva analizatora ne mogu se koristiti istovremeno. Kod zamjene postojeće metode potrebno je izvjesno vrijeme TM određivati na oba analizatora.

e-pošta: ilza.salamunic@gmail.com

P12-7

Comparison of different immunoassays for tumor marker

Salamunić I, Bilopavlović N, Galetović A, Pauković Sekulić B, Tandara L

Department of Medical Laboratory Diagnosis, Split University Hospital Center, Split, Croatia

Background: The comparability of immunoassay tests on different analyzer is extremely important during the assay validation process. In this study, we investigated the interchangeability of tumor markers (TM) on two different analyzer.

Methods: We tested patient samples for CEA, CA 19-9, CA 15-3, PSA and fPSA. We used Elecsys 2010 (Roche) with electrochemiluminescence detection and AU 3000i (Olympus) with chemiluminescent detection. We performed statistical comparative analysis using commercially available program MedCalc Software.

Results: The correlation coefficient (r) between Elecsys 2010 and AU 3000i were: CEA ($N = 180$, $r = 0.993$), CA 19-9 ($N = 131$, $r = 0.979$), CA 15-3 ($N = 105$, $r = 0.826$), PSA ($N = 148$, $r = 0.986$) and fPSA ($N = 61$, $r = 0.976$). The parameters of Passing-Bablok regression show significant systematic differences among analytical systems for: CEA (95% CI, $a = -0.701$ to -0.470 ; $b = 0.869$ to 0.948), CA 19-9 (95% CI, $a = 1.533$ to 2.476 ; $b = 0.890$ to 0.970), PSA (95% CI, $b = 0.916$ to 0.966), fPSA (95% CI, $b = 0.735$ to 0.829) not for CA 15-3 (95% CI, $a = -1.233$ to 2.327 , $b = 0.867$ to 1.074). Systematic differences between tested analytical systems evaluated by Bland-Altman method were: CEA Elecsys-AU3000i (95% CI = -50.4 to 43.2), CA 19-9 Elecsys-AU3000i (95% CI = -111.1 to 87.6), CA 15-3 Elecsys-AU3000i (95% CI = -727 to 817.8), PSA Elecsys-AU3000i (95% CI = -11.1 to 8.9) and fPSA Elecsys-AU3000i (95% CI = -1.13 to 0.49).

Conclusion: The results of determining TM cannot be substitute for one analytical system to another. If TM method is changed, parallel measurements of TM with both methods for an appropriate time span strongly recommended.

e-mail: ilza.salamunic@gmail.com

P12-8

Biokemijski pokazatelji statusa željeza i načini izračuna zasićenja transferina

Mujagić R¹, Vrkić N², Getaldić B², Vukelić N², Futač D², Kvaternik M²

¹Medicinsko biokemijski laboratorij, Opća bolnica Pula, Pula

²Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Uvod: Procjena i razlikovanje funkcionalnog naspram stvarnog nedostatka željeza te toksičnosti željeza u kliničkoj praksi temelji se na biokemijskim pokazateljima statusa željeza, primjerice, na zasićenju transferina i koncentraciji feritina. Odabir dijagnostičkih pretraga u procjeni statusa željeza izrazito je važan s obzirom da se odluka o vrsti i načinu liječenja bolesnika temelji na rezultatima tih pretraga.

Materijali i metode: Uzorci krvi prikupljeni su od bolesnika (N = 34) s dijagnosticiranom bolešću jetre. Na zahtjev liječnika, određivani su biokemijski pokazatelji statusa željeza: koncentracija željeza (Fe), nezasićeni kapacitet vezanja željeza (UIBC) i ukupni kapacitet vezanja željeza (TIBC). U ostalnim uzorcima seruma dodatno je određivana koncentracija transferina (Tf). Nadalje, pomoću opće prihvaćenih empirijskih jednadžbi izračunano je zasićenje transferina željezom (TSAT) na dva različita načina: Jednadžba I (Fe&UIBC): $TSAT\% = 100 \times Fe / (UIBC + Fe)$ i Jednadžba II (Fe&Tf): $Tsat\% = 3,98 \times Fe / Tf$.

Rezultati: Ukupna pogreška izračunske vrijednosti TSAT objedinjuje analitičke pogreške mjerenih parametara koji su dio jednadžbe za izračun. Računske izvedenice TSAT% i Tsat% uspoređene su statističkim analizama po Passing&Babloku i Bland&Altmanu (MedCalc, v10.1.8). Nije nađeno značajno odstupanje od linearnosti ($P > 0,10$), a pripadna regresijska jednadžba pravca je: $TSAT\% = 1,084 \times Tsat\% + 0,774$. Zasićenje transferina koje je izračunano pomoću prve jednadžbe (Tsat%) bilo je 11,4% (95% CI = 9,4-13,3) više u usporedbi s TSAT koji je izračunan pomoću druge jednadžbe (TSAT%).

Zaključak: Uputno je učiniti vrednovanje i ocjenu novih metoda ili poboljšanih načina za izravno spektrofotometrijsko određivanje UIBC. Izračun zasićenja transferina pomoću druge jednadžbe je točnije u usporedbi s drugim zamjenskim metodama izračuna TSAT.

e-pošta: renat.mujagic@pu.t-com.hr

P12-8

Biochemical indicators of iron status and modalities for calculation of transferrin saturation

Mujagić R¹, Vrkić N², Getaldić B², Vukelić N², Futač D², Kvaternik M²

¹Medical Biochemistry Laboratory, Pula General Hospital, Pula, Croatia

²University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Background: Estimation and differentiation of functional versus absolute iron deficiency as well as iron toxicity in clinical praxis is based on biochemical indicators of iron status such as transferrin saturation or ferritin concentration. Selection of diagnostic tests for iron status estimation is very important because therapy strategy is based on these results.

Materials and methods: Blood samples (N = 34) had been collected from the patients with liver disease. At the request of the physician, blood samples were analyzed for the biochemical indicators of iron status: iron concentration (Fe), unsaturated iron binding capacity (UIBC) and total iron binding capacity (TIBC). Transferrin concentration (Tf) was additionally determined in the residual samples. Furthermore, transferrin saturation (TSAT) was calculated by using the widely accepted two different empirical equations: Equation I (Fe&UIBC): $TSAT\% = 100 \times Fe / (UIBC + Fe)$ and Equation II (Fe&Tf): $Tsat\% = 3.98 \times Fe / Tf$.

Results: Total error of the calculated TSAT value summarizes analytical errors of the measured parameters that participate in equations. Derived parameters TSAT% and Tsat% were compared by Passing&Bablok and Bland&Altman statistical methods (MedCalc, v10.1.8). There was no significant deviations from linearity ($P > 0.10$) and the computed linear regression equation was: $TSAT\% = 1.084 \times Tsat\% + 0.774$. Transferrin saturation that has been computed by the first equation (Tsat%) was 11.4% (95% CI = 9.4-13.3) higher in comparison with the TSAT that has been computed by the second equation (TSAT%).

Conclusion: Therefore, method evaluation is recommended before applying a new or improved assay for direct spectrophotometric determination of UIBC. Transferrin saturation calculated by second equation is more accurate method in comparison with the other alternative methods to assess TSAT.

e-mail: renat.mujagic@pu.t-com.hr

P12-9

Usporedba CA19-9, CEA i AFP na analizatorima Vitros ECI i Cobas e411

Unić A, Đerek L, Serdar T, Stančin N, Šprajc N, Romić Ž

Klinička bolnica Dubrava, Zagreb

Uvod: Uspoređivane su vrijednosti tri tumorska biljega, CA19-9, CEA i AFP, dobivene na analizatorima Vitros ECI (Ortho Clinical Diagnostics, Johnson and Johnson, UK) te Cobas e 411 (Roche Diagnostics, Japan), u svrhu validacije metode radi uvođenja novog analizatora. Cilj rada bio je ispitati odnos dviju metoda pri određivanju tumorskih biljega.

Materijali i metode: U ispitivanje je uključeno 26 uzoraka seruma za usporedbu CA 19-9, 20 uzoraka za CEA i 18 za AFP. Vitros Eci je imunokemijski analizator koji radi na principu kemiluminiscencije, a Cobas e 411 na principu elektrokemiluminiscencije. Metode su uspoređene Passing-Bablok regresijom.

Rezultati: Passing-Bablok regresijom dobiveni su sljedeće vrijednosti odsjeka na osi y te nagiba pravca i pripadajući 95% intervali pouzdanosti: za CA19-9 0,8418 (-0,1021-2,9266) i 0,9977 (0,7793-1,0639); za CEA 1,0289 (0,8478-1,1875) i 0,9016 (0,8388-0,9979); za AFP 0,7081 (0,5436-0,8375) i 0,7932 (0,7357-0,8515). U sklopu Passing-Bablok regresije učinjen je Cusum test linearnosti koji je za sve gore navedene kombinacije tumorskih biljega pokazao da nema značajnog odstupanja od linearnosti ($P > 0,10$).

Zaključak: Iz podataka dobivenih Passing-Bablok regresijom vidljivo je da nisu svi rezultati usporedbe u potpunosti usklađeni i ne slijede jednaku linearnost (nagib i odsječak na osi y ne obuhvaćaju 1 odnosno 0). Jedino CA19-9 zadovoljava sve postavke Passing-Bablok regresije. CEA je pokazao dobru usklađenost, ali ne slijedi jednaku linearnost. AFP nije zadovoljio uvjet usklađenosti niti linearnosti. Ovi rezultati potvrđuju važnost preporuke o praćenju vrijednosti tumorskih biljega na istom analizatoru istom metodom.

e-pošta: adrianaunic@gmail.com

P12-9

Comparison of CA19-9, CEA and AFP on Vitros ECI and Cobas e411 analyzers

Unić A, Đerek L, Serdar T, Stančin N, Šprajc N, Romić Ž

Dubrava University hospital, Zagreb, Croatia

Background: We compared the values of three tumor markers, CA19-9, CEA and AFP, obtained on Vitros ECI (Ortho Clinical Diagnostics, Johnson and Johnson, UK) and Cobas e411 analyzer (Roche Diagnostics, Japan), as a part of method validation for the new analyzer. The aim of the study was to examine the relationship between two methods for determining tumor markers concentrations.

Materials and methods: The study included 26 sera for CA19-9, 20 for CEA and 18 for AFP. Vitros ECI is immunochemical analyzer that works on chemiluminescence and Cobas e411 on electrochemiluminescence principle. Methods were compared using Passing-Bablok regression.

Results: The values of the intercept and slope with 95% confidence interval obtained with Passing-Bablok regression were as follows: for CA19-9 0.8418 (-0.1021-2.9266) and 0.9977 (0.7793-1.0639); for CEA 1.0289 (0.8478-1.1875) and 0.9016 (0.8388-0.9979); for AFP 0.7081 (0.5436-0.8375) and 0.7932 (0.7357-0.8515). The Cusum linearity test performed on Passing-Bablok regression showed that there was no significant deviation from linearity for any of the above tumor markers combinations ($P > 0.10$).

Conclusion: Data obtained by Passing-Bablok regression showed that the results are not completely comparable and they do not follow the same linearity (slope and intercept on the y axis does not include 1 or 0). Only CA19-9 fulfilled settings of Passing-Bablok regression. CEA showed good comparability, but does not follow the same linearity. AFP did not meet the requirement of comparability, nor linearity. These results confirm the importance of recommendations on monitoring the values of tumor markers on the same analyzer with the same method.

e-mail: adrianaunic@gmail.com

P12-10

Usporedba brojanja eritrocita i leukocita manualnom mikroskopijom sa dva analizatora za čitanje test traka u mokraći: LabUMat i Clinitek 500

Sikirica M, Flegar-Meštrić Z

Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

Uvod: Analiza mokraće test trakama ima važnu ulogu u kompletnoj analizi mokraće. Automatizacijom čitača test traka omogućeno je da dobivene nalaze izražavamo semikvantitativno. U ovom radu smo željeli usporediti rezultate dobivene reflektometrijom i manualnom mikroskopijom.

Materijali i metode: Ispitali smo razinu slaganja između dva analizatora za čitanje test traka u mokraći: LabUMat 77Elektronika Kft., Hungary i Clinitek 500, Bayer Corporation, Diagnostics Division, Tarrytown, NY sa manualnom mikroskopijom supravitalno obojenog sedimenta u detekciji i brojanju eritrocita (Erc) i leukocita (Lkc). Analizirali smo 165 uzoraka mokraće bez centrifugiranja za brojanje Erc i Lkc na dva analizatora za čitanje test traka: Clinitek 500 i LabUMat dobivene reflektometrijskim mjerenjem sa manualnom mikroskopijom priređenom prema preporukama europske grupe za analizu mokraće (ELM - European Urinalysis Group).

Rezultati: Rezultate smo grupirali u četiri kategorije i izračunali razinu slaganja izraženu kao postotak (%). Slaganje u brojanju Erc i Lkc između dva analizatora Clinitek 500 prema LabUMat pokazuje razinu slaganja od 90% odnosno 84%; između Clinitek 500 i manualne mikroskopije 83% odnosno 81% i između analizatora LabUMat i manualne mikroskopije ta razina slaganja je 80% odnosno 78%.

Zaključak: Dobiveni rezultati na oba analizatora pokazuju slične rezultate koji osiguravaju kliničku prihvatljivost dobivenih rezultata. Razlike u rezultatima dobivenim između rezultata za brojanje Erc i Lkc na analizatorima za čitanje test traka sa onima dobivenim manualnom mikroskopijom suprevitalno obojenog uzorka su temeljene na različitim metodologijama. Analizatori za čitanje test traka mjere enzimsku aktivnost, a ne broje stanice. Zbog toga svaki pozitivan rezultat treba biti potvrđen mikroskopskim pregledom.

e-pošta: mirjana.sikirica@gmail.com

P12-10

Comparison between manual count erithrocytes and leukocytes with two test strips urine analyzers: LabUMat and Clinitek 500

Sikirica M, Flegar-Meštrić Z

Institute of Clinical Chemistry, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

Introduction: Test strip analysis plays an important role in urinalysis. Automated test strips urine analyzers are now available to report semiquantitative data. In this study, we wanted to compare the reflectance readings with manual microscopy.

Materials and methods: We evaluated concordance level between two automated test strips urine analyzers: LabUMat 77Elektronika Kft., Hungary and Clinitek 500, Bayer Corporation, Diagnostics Division, Tarrytown, NY with manual microscopy of supravitally stained specimens in detecting and counting erithrocytes (RBC) and leukocytes (WBC). We analyzed 165 urine specimens without centrifugation for RBC and WBC counting by two urine analyzers, Clinitek 500 and LabUMat based on reflectance measurement with manual microscopy performed according the European Urinalysis Guidelines (ELM - European Urinalysis Group)) recommendations.

Results: The results have been categorized into four ranges and calculated concordance level expressed as percent (%). The agreement for RBC and WBC made by two urine analyzers Clinitek 500 versus LabUMat showed a concordance level of 90% and 84% respectively; between Clinitek 500 with manual microscopy of 83% and 81% and between urine analyzer LabUMat with manual microscopy showed a concordance level of 80% and 78% respectively.

Conclusion: Both test strip analyzers showed similar results provides clinically acceptable results. The differences observed between the results obtained for RBC and WBC with test strip urine analyzers with those obtained with manual microscopy of supravitally stained specimens are based on the different methodology. The strip test analyzers measure enzymatic activity and do not count cell units. Therefore each positive results must be confirmation by microscopy.

e-mail: mirjana.sikirica@gmail.com

P12-11

Procjena testa za određivanje fruktozamina na analizatoru Vitalab

Ćorić J¹, Jadrić R², Panjeta M¹

¹Zavod za kliničku kemiju i biokemiju, Univerzitetni Klinički Centar Sarajevo, Sarajevo, Bosna i Hercegovina

²Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Katedra za biokemiju, Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Uvod: Fruktozamin je glikirani protein i indikator prosječne (vremenski) koncentracije glukoze u krvi te se rabi za procjenu glikemijskog statusa šećerne boelsti.

Materijali imetode: Procjenili smo metodu fruktazaminom na Vitalab analizatoru. Fruktozamin u svom ketoaminskom obliku u lužnatim uvjetima reducira tetrazolijevu sol NBT u formazan. Brzina reagiranja izmjerena fotometrijski na 550 nm, izravno je poporcionalna s koncentracijom fruktozamina u uzorku.

Rezultati: Osjetljivost metode bila je 10 umol/L. Preciznost unutar serije (N = 20) iznosila je 1-2,3% (CV) za uzorke s koncentracijom fruktozamina od 197-587 umol/L. Preciznost iz serije u seriju (N = 20) iznosila je 2,2% za uzorke sa srednjom vrijednosti koncentracije od 552 umol/L i 4,7% za uzorke sa srednjom vrijednosti koncentracije od 217 umol/L. Prošireni raspon mjerenja iznosio je do 2000 umol/L s automatskim razrjeđenjem. Regresijskom analizom usporedbe Vitalab metode (y) i Abbottove metode (x) dobivena je sljedeća jednadžba: $y = 1,10x - 21,1$ i koeficijent korelacije (r) od 0,98.

Zaključak: Metoda fruktozaminom na Vitalab analizatoru je točna i precizna.

e-pošta: rjadric@hotmail.com

P12-11

Evaluation of fructosamine assay on the Vitalab analyzer

Ćorić J¹, Jadrić R², Panjeta M¹

¹Institute for Clinical Chemistry and Biochemistry, Clinical Centre University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

²Department for Biochemistry, Medical Faculty, University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Introduction: Fructosamine is a glycated protein and a time-averaged indicator of blood glucose level, that is used to assess the glycaemic status of diabetes.

Material and methods: We evaluated a fructosamine method on Vitalab analyzer. Fructosamine, in its ketoaminic form, reduces in an alkaline medium, with nitroblue tetrazolium, to formazan. The reaction rate, measured photometrically at 550 nm, is directly proportional to the concentration of fructosamine present in the sample.

Results: The sensitivity of the assay was 10 umol/L. The within-run precision (N = 20) was from 1-2.3% (CV) for samples with fructosamine concentrations from 197-587 umol/L. The between-day precision (N = 20) was 2.2 % for a sample with a mean concentrations of 552 umol/L and 4.7% for a sample with a mean concentrations of 217 umol/L. The extended measurement range is up to 2000 umol/L with automatic dilution. Regression analysis comparing the Vitalab assay (y) and Abbott method (x) yielded the following equation: $y = 1.10x - 21.1$ and correlation coefficient (r) of 0.98.

Conclusion: The fructosamine method on Vitalab analyzer is accurate and precise.

e-mail: rjadric@hotmail.com

P12-12

Usporedba vrijednosti koncentracije glukoze, ureje i kreatinina iz pune krvi (EDTA) i seruma kao uzorka na različitim analizatorima

Kozić I, Rumenjak V

Zavod za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku, Opća bolnica Sveti Duh, Zagreb

Uvod: Jedan od načina skraćivanja TATA (engl. *turn around time*, vrijeme od vađenja uzorka do izdavanja nalaza) u hitnim laboratorijima je izvođenje testova iz pune krvi. Cilj je ovoga rada bila usporedba dobivenih vrijednos-

P12-12

Comparison of the values of metabolites glucose, urea and creatinine using whole blood (EDTA) and serum as a sample on different analyzers

Kozić I, Rumenjak V

Department for clinical laboratory diagnostics, Sveti Duh General Hospital, Zagreb, Croatia

Background: One way to make TAT (turn around time) shorter in emergency laboratories is performing the tests using whole blood as a sample. The purpose of this work was to compare the obtained values of glucose, BUN

ti glukoze, ureje (BUN) i kreatinina iz pune krvi (EDTA) na acidobaznom analizatoru Stat Profile Critical Care Xpress CCX (Nova Biomedical) i vrijednosti istih metabolita iz seruma kao uzorka na biokemijskom analizatoru Olympus AU 400.

Materijali i metode: Kao uzorci korištene su pune krvi (EDTA) i serumi ležećih pacijenata. Ponovljivost u seriji i ponovljivost iz dana u dan na acido-baznom analizatoru CCX određena je korištenjem kontrola proizvođača.

Rezultati: Ponovljivost u seriji za glukozu izražena preko koeficijenta varijacije iznosila je KV = 0,6%, za BUN KV = 2,7%, za kreatinin KV = 1%. Ponovljivost iz dana u dan za glukozu KV = 0,5%, BUN KV = 4,6%, kreatinin KV = 4%. Podaci dobiveni usporednim određivanjem glukoze iz seruma na OLY AU 400, te glukoze iz pune krvi (EDTA) na CCX-u (N = 88) statistički su obrađeni te je dobivena zadovoljavajuća korelacija uz $R^2 = 0,8919$. Za kreatinin (N = 84) koeficijent korelacije je iznosio $R^2 = 0,9819$, dok je za BUN (N = 60) koeficijent iznosio 0,964.

Zaključak: Iz dobivenih je rezultata vidljivo da postoji značajna korelacija dobivenih rezultata za metabolite glukozu, BUN i kreatinin određenih iz seruma na analizatoru Olympus AU 400 sa rezultatima iz pune krvi kao uzorka na acido-baznom analizatoru CCX. Može se donijeti zaključak da je moguće glukozu, BUN i kreatinin kao najznačajnije metabolite odrediti iz pune krvi (EDTA) i tako značajno smanjiti TAT.

e-pošta: irenakozic@yahoo.com

P12-13

Procjena Nova StatStrip glukometra u odnosu na točnost, preciznost i interferencije

Rumenjak V, Kožić I

Zavod za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku, Opća bolnica Sveti Duh, Zagreb

Cilj: Poznato je, da biokemijski sastav i matriks pune krvi mogu značajno utjecati na mjerenje glukoze glukometrima. Nova generacija StatStrip (Nova Biomedical Waltman, SAD) glukometara konstruirana je tako da uklanja interferencije.

Materijali i metode: Ispitivanje korelacije provedeno je ispitivanjem uzoraka venske krvi kod bolesnika u intenzivnoj jedinici i kod bolesnika na kroničnoj dijalizi. Korelacija je provedena analizom uzoraka na dva glukometra koji su do sada korišteni i na StatStrip glukometru. Kao referenzna metoda korištena je metoda sa heksokinazom

and creatinine using whole blood (EDTA) as a sample on a blood gas analyzer Stat Profile Critical Care Xpress CCX (Nova Biomedical) and the values of metabolites using serum as a sample on the Olympus AU 400 biochemistry analyzer.

Materials and methods: As samples we used whole blood (EDTA) and serums of hospital patients. Repeatability of serial sampling and day by day repeatability of the given metabolites was determined using quality control samples.

Results: Repeatability of serial sampling for glucose described by coefficient of variation was CV = 0.6%, for BUN CV = 2.7% and for creatinine 1%. Day by day repeatability is for glucose CV = 0.5%, for BUN CV = 4.6% and for creatinine CV = 4%. The obtained results were statistically processed the correlation coefficient between the two analyzers and two different samples for glucose (N = 88) was $R^2 = 0.8919$, for BUN (N = 60) was $R^2 = 0.964$ and for creatinine (N = 84) $R^2 = 0.9819$.

Conclusions: From the obtained results it can be seen that the correlation of the results for the metabolites glucose, BUN and creatinine using serum as a sample on the biochemistry analyzer Olympus AU 400 and the results for the same metabolites using whole blood as a sample on the blood gas analyzer CCX is significant. Also using whole blood as a sample we can make TAT considerably shorter.

e-mail: irenakozic@yahoo.com

P12-13

Assessment of Nova StatStrip blood glucose meter for accuracy, precision and interferences

Rumenjak V, Kožić I

Department for clinical laboratory diagnostics, Sveti Duh General Hospital, Zagreb, Croatia

Aim: It is now recognized that the accuracy of commonly used hospital glucose meters is adversely affected by the biochemical composition and matrix of blood in critical ill patients. The aim of the study is to evaluate a new generation meter (StatStrip Glucose Nova Biomedical Waltman, MA) that has been designed to compensate for these interference effects.

Material and methods: Whole blood venous samples were collected from patients admitted to ICU and from patients attending for dialysis treatment. Correlation studies were performed by analyzing the venous whole

(Olympus AU 400). Vrijednosti hematokrita određene su na hematološkom analizatoru Sysmex KX 2100. Korelacija je učinjena metodom linearne regresije, a klinička točnost i preciznost usporedbom rezultata prema kriterijima standarda ISO15197 za procjenu glukometra.

Rezultati: Linearna regresijska analiza pokazala je dobru korelaciju za sve ispitivane glukometre. Srednje odstupanje za referentnu metodu bilo je niže za StatStrip glukometar u odnosu na Roche Accu chek Performa i Roche Accu chek active glukometre. Kod bolesnika na kroničnoj dijalizi StatStrip glukometar je pokazao podudarnost sa kriterijima prema ISO15197, dok Roche Accu chek Performa i Roche Accu chek Active nisu. Kod bolesnika u intenzivnoj jedinici utvrđen je negativan bias praćen povećanjem vrijednosti hematokrita kod Roche Accu chek glukometra. Vrijednosti hematokrita nisu utjecale na vrijednosti glukoze izmjerene StatStrip glukometrom

Zaključak: Iz dobivenih rezultata proizlazi prednost StatStrip glukometra u povećanju točnosti mjerenja glukoze.

e-pošta: irenakozić@yahoo.com

blood samples on two commonly used glucose meters and StatStrip Glucose. Serum samples prepared from the whole blood sample were tested using a reference plasma hexokinase method (Olympus AU 400). Hematocrit values were measured using a Sysmex KX 2100. Method correlation was assessed by linear regression analysis and the clinical accuracy was assessed by comparing the pattern of results to the ISO15197 criteria for blood glucose monitoring.

Results: Linear regression analysis showed good correlations for all tested meters. Median bias from the reference method was lower for the StatStrip than for either Roche Accu-chek Performa or Roche Accu-chek Active. For the Dialysis patient population StatStrip Glucose met the accuracy acceptance criteria of ISO 15197 but Roche Accu-chek Performa did not. For the ICU patients there is a negative bias associated with increasing hematocrit for the Roche Accu chek Active meter. StatStrip Glucose was unaffected by hematocrit.

Conclusions: StatStrip Glucose offers the potential for improved accuracy of glucose monitoring in hospitalized patients.

e-mail: irenakozić@yahoo.com

P12-14

Analitička procjena metoda za TSH, tT3 i tT4

Ruljančić N¹, Mihanović M, Bakliža A¹, Rumenjak V³

¹Psihijatrijska bolnica Sveti Ivan, Medicinsko biokemijski laboratorij, Zagreb

²Psihijatrijska bolnica Sveti Ivan, Zagreb

³Zavod za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku, Opća bolnica Sveti Duh, Zagreb

Uvod: Proveden je kratki evaluacijski postupak analitičkog sustava sukladno CLSI preporukama sa statističkim modelom EP-Evaluator® za procjenu metoda i to za: EP5-protokol – nepreciznost (SD i CV unutar serije, između serije, ukupni CV); EP10-protokol – preliminarna evaluacija novih metoda za linearnost, test iskorištenja, nepreciznost, bias, "carryover"; EP9-protokol – usporedba metoda. Valjanost metoda je utvrđena u odnosu na tri kriterija: prema proizvođačevim kriterijima (SDP unutar serije i CVP unutar serije); prema kriterijima državne vanjske kontrole rezultata za bias (B%DK) i prema biološkoj bazi podataka za TE%B, CV%B i B%B.

Materijali i metode: 1. metoda – Analizator Elysis Uno ELISA test za TSH (test druge gen., analitička osjetljivost manja od 0,10 mIU/L), T3 i T4; 2. metoda – Analizator Vitos ECI CLIA metoda za TSH (test treće gen., analitička osjetljivost manja od 0,02 mIU/L), T3 i T4. Za uzorke su ko-

P12-14

Analytical evaluation of TSH, tT3 and tT4 assays

Ruljančić N¹, Mihanović M², Bakliža A¹, Rumenjak V³

¹Clinical laboratory, Sveti Ivan Psychiatric hospital, Zagreb, Croatia

²Sveti Ivan Psychiatric hospital, Zagreb, Croatia

³Department for clinical laboratory diagnostics, Sveti Duh General Hospital, Zagreb, Croatia

Introduction: The short evaluation for analytical system was performed according to CLSI protocols. Statistical analysis was performed using EP-Evaluator®: EP5-protocol – imprecision (SD and CV within- and between run, total CV); EP10-protocol – preliminary evaluation for linearity, recovery, precision, bias, carryover and drift; EP9-protocol – method comparison. Interpretations of results were performed according to three criteria: vendor's claimed for SDP within run and CVP within run; national periodic proficiency testing surveys for bias (B%DK) and european biologic goals and calculated biological allowable total errors TE%B, CV%B and B%B.

Materials and methods: 1. method – Analyzer Elisys Uno ELISA assay for TSH (2nd gen., analytic sensitivity lower than 0.10 mIU/L), T3 and T4; 2. method – Analyzer Vitos ECI CLIA method for TSH (3rd gen., analytic sensitivity

rišteni: a) Biorad kontrolni serum (L1, L2, L3) za EP5 i EP10 protokol i b) 92 seruma ispitanika za usporedbu metoda prema EP9-protokolu.

Rezultati: EP5 protokol: a) korisnikov SDE i CV%E manji od SDP unutar serije i CVP unutar serije za TSH, T3 i T4; b) korisnikov CV%ukE veći od CV%B za TSH, T3 i T4. EP10 protokol: a) korisnikov CV%ukE veći od CV%B za TSH, T3 i T4; b) korisnikov bias B%E manji od B%DK za TSH, T3 i T4; c) t-vrijednost manja od 4,6 za odsječak, nagib, %"carryover", test iskorištenja, linearnost, osim za vrijednost za nagib za TSH ($t = 16,6$). EP9 protokol: a) koeficijent korelacije veći od 0,975 ($r = 0,9775$, $B\% = -1,4$) za TSH, r je manji od 0,975 za T3 ($r = 0,8360$, $B\% = 0,16$) i T4 ($r = 0,8070$, $B\% = 1,8\%$); b) TE% između metoda veći od TE%B.

Zaključak: Metode za određivanje hormona štitnjače zadovoljavaju nepreciznost prema proizvođačevim zahtjevima, ali ne prema biološkim kriterijima. Metode zadovoljavaju bias prema kriterijima vanjske procjene kvalitete. Metode se ne mogu ekvivalentno upotrebljavati za praćenje rezultata bolesnika.

e-pošta: n_ruljancic@yahoo.com

P12-15

Analitička validacija biokemijskog analizatora Cobas 6000 analyzer series modul C501

Šupak Smolčić V¹, Bilić-Zulle L^{1,2}, Fišić E¹

¹Zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka

²Katedra za medicinsku informatiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

Uvod: Cobas 6000 (Hitachi, Japan) je biokemijski analizator koji spektrofotometrijski, imunoturbidimetrijski te ion selektivnim elektrodama mjeri biokemijske analite. Prikazan je dio rezultata opsežne validacije analizatora.

Materijali i metode: Validacija je učinjena za 12 analita, predstavnika metabolita, enzima, elemenata u tragovima, specifičnih proteina i elektrolita. Ispitana je nepreciznost u seriji ($N = 20$), nepreciznost iz dana u dan ($N = 30$) i usporedba s analizatorom korištenim u rutinskom radu (Olympus AU640) ($N = 50$).

Rezultati: Koeficijenti varijacije za nepreciznost u seriji: glukoza = 2,8%, ureja = 0,8%, kreatinin = 4,0%, GGT = 0,8%, AST = 0,6%, ALT = 0,8%, IgG = 3,2%, IgA = 1,1%, IgM = 1,5%, Fe = 0,9%, Na = 0,4% i K = 0,6%, a za nepreciznost između serija: glukoza = 1,6%, ureja = 2,0%, kreatinin = 2,6%, GGT = 1,9%, AST = 2,7%, ALT = 1,7%, IgG = 2,5%, IgA = 3,2%, IgM = 7,9%, Fe = 3,2%, Na = 1,3%, K = 2,0%.

lower than 0.02 mIU/L), T3 and T4. For samples we have used: a) Biorad control serum L1, L2, L3 for EP5 and EP10 protocol and b) 92 patient's serum samples for method comparison according EP9-protocol.

Results: EP5-protocol: a) users SDE and CV%E lower than SDP within run and CVP within run for TSH, T3 and T4; b) users CV%totE higher than CV%B for TSH, T3 and T4. EP10-protocol: a) users CV%totE higher than CV%B for TSH, T3 and T4; b) users bias B%E lower than B%DK for TSH, T3 and T4 and c) t-value lower than 4.6 for intercept, slope, %carryover, recovery, linearity, except for TSH slope ($t = 16.6$). EP9-protocol: a) correlation coefficient higher than 0.975 for TSH ($r = 0.9775$, $B\% = -1.4$), r lower than 0.975 for T3 ($r = 0.8360$, $B\% = 0.16$) and T4 ($r = 0.8070$, $B\% = 1.8\%$); b) TE% between method higher than allowable TE%B.

Conclusion: Methods for determination of TSH, T3 and T4 met allowable vendor's claimed for imprecision but did not met european biologic goals for CV%B. Methods met allowable bias (B%DK) according to national periodic proficiency testing surveys. Methods comparisons show that these two methods should not be used like equivalence.

e-mail: n_ruljancic@yahoo.com

P12-15

Analytic validation of biochemistry analyzer Cobas 6000 analyzer series modul C501

Šupak Smolčić V¹, Bilić-Zulle L^{1,2}, Fišić E¹

¹Institute of Laboratory Diagnostics, Rijeka Clinical Hospital Center, Rijeka, Croatia

²Department of Medical Informatics, Rijeka University School of Medicine, Rijeka, Croatia

Introduction: Cobas 6000 (Hitachi, Japan) is biochemistry analyzer for spectrophotometric, immunoturbidimetric and ion-selective determination of biochemical analytes. Here we present part of comprehensive analyzer validation.

Materials and methods: Validation was made for 12 analytes which represent following groups: metabolites, enzymes, trace elements, specific proteins and electrolytes. Research included determination of within-run imprecision ($N = 20$), between-run imprecision ($N = 30$), and method comparison with routine biochemistry analyzer (Olympus AU640) ($N = 50$).

Results: Within-run imprecision coefficients of variations are: glucose = 2.8%, urea = 0.8%, creatinine = 4.0%, GGT = 0.8%, AST = 0.6%, ALT = 0.8%, IgG = 3.2%, IgA = 1.1%, IgM = 1.5%, Fe = 0.9%, Na = 0.4% i K = 0.6%, and between-run imprecision coefficients of variations are: glucose =

Pri usporedbi dvaju analizatora koeficijent korelacije za sve ispitivane analite iznosi $r > 0,99$ osim za Na ($r = 0,97$). Usporedba metoda učinjena je s pomoću Passing-Bablok regresije i izračunate su jednadžbe pravca za sve analite te 95% interval pouzdanosti za odsječak i nagib pravca. Za ureju, Na i K interval pouzdanosti za odsječak obuhvaća vrijednost nula, a za nagib vrijednost jedan pa su sasvim suglasni s rutinski korištenom metodom. Usporedba za AST, ALT, IgM i Fe ukazuje na postojanje male konstantne pogreške (CI odsječka ne obuhvaća vrijednost nula), a za IgG postojanje male proporcionalne pogreške (CI za nagib ne obuhvaća vrijednost jedan). Male vrijednosti konstantne i proporcionalne pogreške pronađene su za glukozu, kreatinin, GGT i IgA.

Zaključak: S obzirom na niske vrijednosti CV instrument je zadovoljavajuće točnosti i preciznosti. Većina analita je usklađena na oba analizatora dok su za dio potrebna podešenja nagiba i odsječka pravca za potpunu usklađenost.

e-pošta: vesnasupak@gmail.com

1.6%, urea = 2.0%, creatinine = 2.6%, GGT = 1.9%, AST = 2.7%, ALT = 1.7%, IgG = 2.5%, IgA = 3.2%, IgM = 7.9%, Fe = 3.2%, Na = 1.3%, K = 2.0%. Method comparison study showed correlation coefficient $r > 0.99$ regarding all tested analytes except for Na $r = 0.97$. Passing-Bablok regression analysis provided linear equation for tested analytes as well as 95% confidence interval for intercept and slope. Intercept confidence interval for urea, Na and K includes zero as value, and slope confidence interval includes one as value which makes these analytes in accordance with routine method. Method comparison regression analysis for AST, ALT, IgM and Fe shows small constant difference (intercept CI does not include zero), and for IgG small proportional difference (slope CI does not include one). Both, small constant and proportional differences, are found for glucose, creatinine, GGT and IgA.

Conclusion: Regarding low CV values tested analyzer has satisfactory accuracy and precision. Most analytes are coherent on both analyzers whereas a part of them require adjustments of slope and intercept for complete accordance.

e-mail: vesnasupak@gmail.com

P13 – Plućne bolesti

P13-1

Hematološki pokazatelji anemije i C-reaktivni protein (CRP) u bolesnika sa stabilnom opstruktivnom plućnom bolesti

Pancirov D¹, Radišić Biljak V², Stjepanović G³, Čepelak I⁴

¹Odjel za biokemijsko-hematološku dijagnostiku, Opća bolnica Dr. Ivo Pedišić, Sisak

²Poliklinika Sunce Zagreb, Zagreb

³Pulmološki odjel, Opća bolnica Dr. Ivo Pedišić, Sisak

⁴Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Uvod: Cilj istraživanja bio je odrediti vrijednosti hematoloških pokazatelja anemije i CRP u bolesnika sa stabilnom KOPB kako bi se utvrdio relativni udio prisutnosti anemije, stupanj sistemske upale te eventualne korelacije navedenih analita u ovih bolesnika.

Materijali i metode: U ispitivanje je bilo uključeno 109 bolesnika s KOPB (forsirani ekspiratorni volumen u 1 sekundi izdisaja, FEV1 = $41 \pm 14\%$), te 51 zdravi ispitanik, FEV1 = $106 \pm 15\%$). U skladu s GOLD smjernicama, bolesnici su podijeljeni u 3 podskupine: II, III i IV, a prema kriteriju SZO za anemiju ($Htc < 0,36$ L/L za žene i $< 0,39$ L/L

P13 – Lung diseases

P13-1

Hematologic markers of anemia and C-reactive protein (CRP) in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease

Pancirov D¹, Radišić Biljak V², Stjepanović G³, Čepelak I⁴

¹Department for biochemistry and hematology diagnostics, Dr. Ivo Pedišić General hospital, Sisak, Croatia

²Sunce IHC, International Health Centre, Zagreb, Croatia

³Department for pulmonology, Dr. Ivo Pedišić General hospital, Sisak, Croatia

⁴Department of Medical Biochemistry and Haematology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Introduction: The goal of this investigation was to determine the value of hematologic markers of anemia and CRP in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease, in purpose to define the relative portion of anemia, degree of systemic inflammation, and occasional correlation of cited data in these patients.

Material and methods: The investigation included 109 patients with COPD (forced expiratory volume in 1 sec. of expiration, FEV1 = $41 \pm 14\%$) and 51 healthy examinee (FEV1 = $106 \pm 15\%$). In accordance with GOLD guidelines, the patients were divided in three subgroups: II, III, IV,

za muškarce) u 2 podskupine: s anemijom i bez anemije. Koncentracija CRP u serumu određena je imunoturbidimetrijskom metodom na analizatoru Dimension Xpand Plus (Siemens Healthcare Diagnostics), a hematološki pokazatelji određeni su metodom protočne citometrije na analizatoru Cell Dyn 3200 (Abbott Diagnostics).

Rezultati: Anemija je prisutna u 21% bolesnika s KOPB. Ne postoji značajna razlika vrijednosti eritrocita, hemoglobina i hematokrita između skupine svih bolesnika i kontrolne skupine, kao ni između bolesnika podijeljenih prema GOLD smjernicama i kontrolne skupine. Koncentracija CRP statistički je značajno veća u skupini svih KOPB bolesnika ($P < 0,001$), svim podskupinama prema GOLD klasifikaciji (II, III, IV: $P < 0,001$), te podskupinama s i bez anemije ($P < 0,001$) u odnosu na kontrolnu skupinu. ROC analiza je pokazala dobru dijagnostičku učinkovitost CRP.

Zaključak: Koncentracija CRP značajno je povećana u svim ispitanim podskupinama bolesnika s KOPB u odnosu na kontrolnu skupinu, ukazujući na kontinuiranu prisutnost upalnog procesa. Anemija je prisutna kod ukupno 21% bolesnika, najvećim dijelom iz GOLD podskupine III.

e-pošta: laboratorij@obs.hr

and according WHO criteria for anemia ($Htc < 0.36$ L/L for females, and < 0.39 L/L for males) in two subgroups: with and without anemia. Concentration of CRP in serum was determined by immunoturbidimetric method with analyzer Dimension Xpand Plus (Siemens Healthcare Diagnostics), and hematologic markers were determined by a method of flow cytometry by Cell Dyn 3200 analyzer (Abbott Diagnostics).

Results: Anemia was present in 21% of patients with COPD. Significant difference for RBC, hemoglobin and hematocrit between total number of patients and controls does not exist, as well as between all the subgroups according to GOLD guidelines and controls. Concentration of CRP is statistically significantly higher in a group of all COPD patients ($P < 0.001$), all the subgroups according to GOLD guidelines (II, III, IV: $P < 0.001$), and subgroups with and without anemia ($P < 0.001$) in correlation with controls. ROC analysis showed good diagnostic effectiveness of CRP.

Conclusion: CRP concentration is significantly elevated in all investigated subgroups of COPD examinees in relation with the controls, pointing to continual presence of inflammation. Anemia is present in 21% of patients, that mostly belong to GOLD subgroup III.

e-mail: laboratorij@obs.hr

P13-2

C-reaktivni protein u stabilnoj kroničnoj opstruktivskoj plućnoj bolesti

Radišić Biljak V¹, Đurić K¹, Čepelak I²,
Žanić Grubišić T², Pancirov D³, Sorić J¹

¹Poliklinika Sunce Zagreb, Zagreb

²Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

³Odjel za biokemijsko-hematološku dijagnostiku, Opća bolnica „Dr. Ivo Pedišić“, Sisak

Uvod: Upala je značajan dio patogeneze kronične opstruktivske plućne bolesti (KOPB). Ispitana je stoga koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP) u bolesnika s različitim stupnjevima KOPB i uspoređena s koncentracijom kontrolne skupine ispitanika.

Materijali i metode: U istraživanje je uključeno 109 bolesnika s KOPB (forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi izdisaja (FEV1) = $41 \pm 14\%$) i 51 zdravi ispitanik (FEV1 = $106 \pm 15\%$). Temeljem nalaza spirometrije, slijedeći GOLD smjernice, pacijenti su podijeljeni prema stadiju progresije bolesti u 3 podskupine (II, III, IV). Koncentracija CRP u serumu određena je imunoturbidimetrijskom me-

P13-2

C-reactive protein in stable chronic obstructive pulmonary disease

Radišić Biljak V¹, Đurić K¹, Čepelak I²,
Žanić Grubišić T², Pancirov D³, Sorić J¹

¹Sunce IHC, International Health Centre, Zagreb, Croatia

²Department of Medical Biochemistry and Haematology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

³Department for biochemistry and hematology diagnostics, Dr. Ivo Pedišić General hospital, Sisak, Croatia

Background: Systemic inflammation is very important feature of the chronic obstructive pulmonary disease (COPD). We studied serum concentration of C-reactive protein (CRP) in patients with different stages of COPD and we compared it with concentration of CRP in healthy controls.

Materials and methods: Concentration of CRP was determined in sera of COPD patients (FEV1 = $41 \pm 14\%$), N = 109; and in healthy controls (FEV1 = $106 \pm 15\%$), N = 51. Patients were divided into three subgroups (II, III, IV) according to GOLD guidelines. Concentration of CRP was determined with immunoturbidimetric method on Di-

todom na analizatoru Dimension Xpand Plus (Siemens Healthcare Diagnostics, USA).

Rezultati: Koncentracija CRP je u serumu ispitanika s KOPB bila statistički značajno veća (medijan 13,78 mg/L, IQR = 8,44-44,46) u odnosu na ispitanike u kontrolnoj skupini (medijan 7,70 mg/L, IQR = 3,36-9,34), $P < 0,001$. ROC-analiza pokazuje da CRP ima vrlo dobru dijagnostičku učinkovitost (AUC = 0,808, 95% CI = 0,739-0,866, $P < 0,001$) u razlikovanju bolesnika s KOPB od zdravih ispitanika. Za graničnu vrijednost CRP od 11,86 mg/L, dijagnostička specifičnost bila je 94%, a osjetljivost 60%. Koncentracije CRP u podskupinama su bile slijedeće: podskupina II – medijan 12,98 mg/L, IQR = 8,35-27,67; podskupina III – medijan 12,73 mg/L, IQR = 7,65-60,07; podskupina IV – medijan 23,18 mg/L, IQR = 11,21-39,17. Koncentracija CRP ne razlikuje se značajno između podskupina bolesnika s KOPB, $P = 0,573$.

Zaključak: Granična vrijednost CRP od 11,86 mg/L mogla bi biti biokemijski pokazatelj, koji bi bio od pomoći u razlikovanju bolesnika s KOPB od zdravih ispitanika, ali ne i kao pokazatelj progresije KOPB.

e-pošta: vanja.radisic@gmail.com

mension Xpand Plus analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, USA).

Results: Concentration of CRP was increased in COPD patients (median 13.78 mg/L, IQR = 8.44-44.46) compared with healthy controls (median 7.70 mg/L, IQR = 3.36-9.34), $P < 0.001$. Specificity and sensitivity of selected marker was analysed by the receiver operating characteristics curve. CRP showed very good diagnostic accuracy in COPD patients (AUC = 0.808, 95% CI = 0.739-0.866, $P = 0.001$). For cut-off value of 11.86 mg/L for CRP concentration, specificity was 94%, and sensitivity was 60%. Concentration of CRP in subgroups were as follows: subgroup II – median 12.98 mg/L, IQR = 8.35-27.67; subgroup III – median 12.73 mg/L, IQR = 7.65-60.07; subgroup IV – median 23.18 mg/L, IQR = 11.21-39.17. There was no significant difference in CRP concentration between subgroups of patients with COPD.

Conclusion: The proposed cut-off value for CRP concentration might be used as biochemical parameter who would be of assistance in distinguishing patients with COPD, however, could not be used for grading severity of disease in patients with COPD.

e-mail: vanja.radisic@gmail.com

P13-3

Oksidacija tiolnih skupina i aktivnost paraoksonaze 1 u bolesnika s kroničnom opstrukcijskom plućnom bolesti

Rumora L, Grdić Rajković M, Puclin G, Posavac K, Čepelak I, Žanić Grubišić T

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Uvod: Kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest (KOPB) karakterizira kronični lokalni i sistemski upalni proces te pojačan oksidacijski stres. Pušenje cigareta se smatra glavnim etiološkim čimbenikom u nastanku i razvoju KOPB. Reaktivne kisikove vrste, čije stvaranje potiču pušenje i aktivirane stanice pluća i krvne tekućine, mogu poremetiti oksidacijsko-redukcijsku ravnotežu na način da oksidiraju proteine u plazmi. Paraoksonaza 1 (PON1) je enzim vezan uglavnom na HDL koji u svojoj strukturi ima tri cisteinska ostatka na pozicijama 41, 284 i 353; C41 i C353 su povezani disulfidnom vezom dok je C284 slobodan. Enzim ima i antiaterogena i antioksidacijska svojstva.

Materijali i metode: Ovo je istraživanje uključilo 107 KOPB bolesnika (32 pušača, 28 bivša pušača, 47 nepušača) i 45 zdravih dobrovoljaca (16 pušača, 13 bivših pušača, 16

P13-3

Protein thiol oxidation and paraoxonase 1 activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease

Rumora L, Grdić Rajković M, Puclin G, Posavac K, Čepelak I, Žanić Grubišić T

Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Introduction: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by chronic local and systemic inflammation, and increased oxidative stress. Cigarette smoking is the major etiological factor responsible for COPD. Reactive oxygen species, generated by cigarette smoke and by activated lung and peripheral blood cells, may disturb redox balance through oxidation of plasma proteins. Paraoxonase 1 (PON1) is an HDL-associated enzyme with three cysteine residues in positions 41, 284 and 353; C41 and C353 form a disulfide bond while C284 is free. The enzyme has both antiatherogenic and antioxidative properties.

Materials and methods: The study was carried out on 107 COPD patients (32 smokers, 28 ex-smokers, 47 non-smokers) and 45 healthy volunteers (16 smokers, 13

nepušača). Tiolne skupine proteina izmjerene su spektrofotometrijskom metodom pomoću 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB). Paraoksonazna aktivnost PON1 određena je na način da se mjerilo otpuštanje p-nitrofenola iz paraoksone bez (bazalna aktivnost PON1) i uz dodatak NaCl (NaCl-stimulirana PON1 aktivnost).

Rezultati: Koncentracija slobodnih sulfhidrilnih skupina značajno je niža u KOPB bolesnika u odnosu na zdrave osobe, a opaženo sniženje nije ovisilo ni o statusu pušenja ni o težini bolesti (GOLD klasifikacija). Osim toga, i bazalna i NaCl-stimulirana aktivnost PON1 također je značajno niža u KOPB bolesnika.

Zaključak: Smanjena koncentracija tiolnih skupina u KOPB bolesnika ukazuje na pojačan oksidacijski stres, što djelomice može objasniti sniženu paraoksonaznu aktivnost PON1.

e-pošta: tihana_zanic@yahoo.co.uk

ex-smokers, 16 non-smokers). Serum protein thiols were measured by a spectrophotometric method using 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Paraoxonase activity of PON1 was assayed by monitoring the release of p-nitrophenol from paraoxon in the absence (basal PON1 activity) or in the presence of NaCl (salt-stimulated PON1 activity).

Results: Proteins thiol concentration was significantly decreased in COPD patients compared with healthy individuals, and this reduction of free sulfhydryl groups was not dependent on smoking status or disease severity (GOLD grade). In addition, both basal and salt-stimulated PON1 activity were also significantly lower in COPD patients.

Conclusion: The decrease in protein thiols observed in COPD patients suggests the increased oxidative stress in those individuals which may explain in part the reduction in PON1 paraoxonase activity.

e-mail: tihana_zanic@yahoo.co.uk

P13-4

Određivanje prokalcitonina kod pulmoloških bolesnika

Šegulja D, Zovko V, Alpeza-Viman I

Klinika za plućne bolesti Jordanovac, Zagreb

Cilj: Cilj rada bio je procijeniti dijagnostičku vrijednost koncentracije prokalcitonina u serumu u odnosu na druge parametre upale (CRP, fibrinogen, broj leukocita, brzina sedimentacije eritrocita) kod pacijenata liječenih u Klinici za plućne bolesti Jordanovac. Mikrobiološka obrada je pri tom uzeta u obzir.

Ispitanici i metode: Ispitivanje je obuhvatilo 40 bolesnika (17 žena i 23 muškarca) s najčešće postavljenim dijagnozama u našoj ustanovi (55% maligne bolesti, 12% pneumonije, 5% tuberkuloza, 2% sarkoidoza, autoimune bolesti, ostali). Koncentracija CRP-a je određivana lateks imunoturbidimetrijom na instrumentu Hitachi 912. Za određivanje brzine sedimentacije korišten je instrument Sedi 15, a koncentracija prokalcitonina određivana je metodom Enzyme-Linked Fluorescent Assay-ELFA (miniVIDAS Biomerieux). Linearnost testa je 0,05-200 ug/L. Prema proizvođaču, kod bolesnika s konc. PCT-a < 0,5 ug/L može se isključiti rizik za razvoj sepse i/ili septičkog šoka.

Rezultati: Kod svih ispitanika nađene su povišene koncentracije CRP-a i sedimentacija eritrocita neovisno o dijagnozi. Mikrobiološka ispitivanja su provedena kod 31 bolesnika. 15 bolesnika je imalo pozitivni nalaz. Kod većine koncentracija prokalcitonina bila je < 0,5 ug/L uz kolo-

P13-4

Determination of procalcitonin in pulmonary patients

Šegulja D, Zovko V, Alpeza-Viman I

University hospital for lung diseases Jordanovac, Zagreb, Croatia

Aim: Aim of the study was to evaluate diagnostic value of procalcitonin concentration in serum in relation to other inflammation markers (CRP, fibrinogen, WBC count, erythrocyte sedimentation rate) among patients treated in Clinic for lung diseases Jordanovac. Microbiological processing is taken into account.

Patients and methods: Testing included 40 patients (17 women and 23 men) with the most frequently diagnosed diseases in our institution (55% malignant diseases, 12% pneumonia, 5%, tuberculosis, 2% sarcoidosis, autoimmune diseases, other). CRP concentration was measured by a latex immunoturbidity method on instrument Hitachi 912. Erythrocyte sedimentation rate was determined on instrument Sedi 15, and procalcitonin concentration was measured by method Enzyme-Linked Fluorescent Assay-ELFA (miniVIDAS bioMérieux). Test linearity for PCT is 0.05-200 ug/L. According to the manufacturer, risk for the development of sepsis and/or septic shock can be excluded in patients with PCT concentration < 0.5 ug/L.

Results: All patients had elevated concentrations of CRP and sedimentation rate regardless of diagnosis. Microbiological tests were done in 31 patients. 15 patients had positive findings. Most of them had procalcitonin concentra-

nizaciju, lokaliziranu infekciju ili infekciju *M. tuberculosis* dok su koncentracije PCT-a > 2,0 ug/L nađene kod teških bakterijskih i gljivičnih infekcija te u jednom slučaju sterilne hemokulture uz radiološki nalaz koji je upućivao na pneumoniju. Kod jednog bolesnika nađen je izrazito visoki PCT (42,73 ug/L) uz nedovoljno kliničkih podataka koji bi potkrijepili taj nalaz.

Zaključak: CRP se pokazao kao osjetljiviji biljeg upale. Iako naše ispitivanje sugerira da je PCT specifičniji biljeg sistemske upale za relevantnu procjenu njegove dijagnostičke vrijednosti kod pulmoloških bolesnika neophodno je provesti dodatna ispitivanja na većem uzorku.

e-pošta: dragana.segulja@gmail.com

tion < 0.5 ug/L with a colonization, localized infection or *M. tuberculosis* infection. PCT concentrations > 2.0 ug/L were found with severe bacterial and fungal infections and in one case of sterile hemoculture with radiological findings which indicated to pneumonia. One patient had extremely high PCT (42.73 ug/L) but there wasn't enough clinical data to support this finding.

Conclusion: CRP has proven to be sensitive marker inflammation. Although our investigation suggests that the PCT is more specific marker for systemic inflammation, it is necessary to do additional tests on a large sample for relevant assessment of its diagnostic value in pulmonary patients.

e-mail: dragana.segulja@gmail.com

P13-5

Aktivnost dipeptidil peptidaze IV kod bolesnika s kroničnom opstrukcijskom plućnom bolesti

Somborac A¹, Ostojić S², Detel D², Pancirov D³, Varljen J², Čepelak I¹

¹Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagrebtia

²Zavod za kemiju i biokemiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka

³Odjel za biokemijsko-hematološku dijagnostiku, Opća bolnica Dr. Ivo Pedišić, Sisak

Uvod: Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) najčešćija je kronična respiratorna bolest progresivnog tijeka. Karakterizirana je ograničenim protokom zraka i nenormalnim upalnim odgovorom pluća na udahnute štetne čestice i plinove. Upala je povezana s infiltracijom imunoloških stanica koje otpuštaju pro-upalne medijatore u pluća. Dipeptidil peptidaza IV (DPP IV) je specifična serinska egzopeptidaza koja uklanja X-Pro dipeptide s različitih pro-upalnih neuropeptida, kemokina, citokina i drugih bioloških molekula. Tako pridonosi njihovoj aktivaciji ili inaktivaciji, odnosno promjeni njihove funkcije. U ovom radu smo ispitivali aktivnost DPP IV u serumu bolesnika s KOPB i povezanost enzimске aktivnosti s progresijom bolesti.

Materijali i metode: U serumu bolesnika sa stabilnim oblikom KOPB (GOLD stadiji II do IV; N = 110) i zdravih ispitanika (N = 91) određena je katalitička aktivnost DPP IV koristeći spektrofotometrijsku metodu s glicil-prolil-p-nitroanilidom kao supstratom.

Rezultati: Katalitička aktivnost DPP IV u serumu bolesnika sa stabilnim oblikom KOPB značajno je snižena u od-

P13-5

Dipeptidyl peptidase IV activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease

Somborac A¹, Ostojić S², Detel D², Pancirov D³, Varljen J², Čepelak I¹

¹Department of Medical Biochemistry and Haematology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

²Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Rijeka, Rijeka, Croatia

³Department for biochemistry and hematology diagnostics, Dr. Ivo Pedišić General hospital, Sisak, Croatia

Background: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is the most common chronic respiratory disease with the progressive course. It is characterised by airflow limitation and abnormal inflammatory response of lungs to noxious particles and gases. Inflammation is associated with the infiltration of immune cells which release pro-inflammatory mediators into the lung. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) is specific serine exopeptidase which selectively removes X-Pro dipeptide from different pro-inflammatory neuropeptides, chemokines, cytokines and other biomolecules. Thus DPP IV contributes to their functional activation or inactivation. In this work we examined DPP IV activity in sera of COPD patients and possible correlation with progression of the disease.

Materials and methods: We obtained serum from patients with stable COPD (GOLD stages II to IV; N = 110) and healthy volunteers (N = 91). DPP IV activity was determined using the spectrophotometric method with the glycyL-prolyl-p-nitroanilid as substrate.

Results: DPP IV activity in sera from COPD patients is significantly reduced comparing to healthy controls (P <

nosu na aktivnost zdravih ispitanika ($P < 0,001$). Između različitih stadija progresije bolesti (GOLD klasifikacija) aktivnost enzima nije značajno različita.

Zaključak: Snižena aktivnost DPP IV u bolesnika s KOPB mogla bi dovesti do smanjenog proteolitičkog cijepanja pro-upalnih medijatora otpuštenih iz imunoloških stanica i tako doprinijeti razvoju lokalne i sistemske upale u KOPB.

e-pošta: icepelak@yahoo.com

0.001). However, there were no significant differences in DPP IV activity between different stages of disease (GOLD classification).

Conclusions: Decreased activity of DPP IV found in COPD patients might be involved in attenuated proteolytic cleavage of pro-inflammatory mediators released by immune cells, thus contributing to the development of local and systemic inflammation in COPD.

e-mail: icepelak@yahoo.com

P14 – Ostalo

P14-1

Procalcitonin u sistemske i lokalnoj bakterijske infekcije

Pavić M, Bronić A, Milevoj Kopčinović L

Klinika za traumatologiju, Zagreb

Uvod: Procalcitonin je predložen kao marker infekcije u kritičnih bolesnika. Cilj ovog rada je bio usporediti vrijednosti PCT-a u bolesnika sa sistemskom i lokalnom bakterijskom infekcijom.

Materijali i metode: Na temelju kliničkih i mikrobioloških nalaza svrstali smo 25 bolesnika u dvije skupine: skupina A-bolesnici sa sistemskom bakterijskom infekcijom (pozitivne hemokulture) i skupina B-lokalna bakterijska infekcija (pozitivne druge kulture). Svim bolesnicima odredili smo C-reaktivni protein (CRP), PCT, leukocite, nesegmentirane neutrofile i trombocite. PCT je određen enzim-fluorometrijskim metodom (miniVidas), a CRP imunosimetrijskim metodom (Dimension Xpand). Broj leukocita i trombocita određen je na XT-1800i (Sysmex). Diferencijalna krvna slika određena je mikroskopskom metodom u obojenom razmazu periferne krvi. Podatci su obrađeni upotrebom Medcalc software. Razina značajnosti postavljena je na $P < 0,05$.

Rezultati: Medijani koncentracija PCT-a bili su u skupini A 1,32 (raspon: 0,13-7,37) ng/mL, a u skupini B 0,21 (raspon: 0,05-9,07) ng/mL i razlike između skupina bile su statistički značajne ($P = 0,038$). Značajno viši medijan broja trombocita ($P = 0,012$) nađen je u skupini B (327, raspon: $40-325 \times 10^9/L$) u usporedbi sa skupinom A (140, raspon: $40-325 \times 10^9/L$). Suprotno ovome, vrijednosti medijana CRP-a, leukocita i nesegmentiranih neutrofila nisu bile značajno različite između skupina ($P = 0,071$; $P = 0,189$; $P = 0,239$).

Zaključak: Prema dobivenim rezultatima, više koncentracije PCT-a u kombinaciji sa nižim brojem trombocita u bo-

P14 – Other

P14-1

Procalcitonin in systemic and local bacterial infection

Pavić M, Bronić A, Milevoj Kopčinović L

University Hospital of Traumatology, Zagreb, Croatia

Background: Procalcitonin (PCT) has been proposed as a marker of infection in critically ill patients. The aim of the study was to compare the serum concentrations of PCT in patients with systemic and local bacterial infection.

Materials and methods: According to clinical and microbiologic findings we divided 25 patients into two groups: group A-patients with systemic bacterial infection (positive blood cultures) and group B-local bacterial infection (other positive cultures). We determined in all patients C-reactive protein (CRP), PCT, leukocyte, non-segmented neutrophile and platelet count. PCT was measured by enzyme-linked fluorescent immunoassay (miniVidas) and CRP by immunoturbidimetric method (Dimension Xpand). Leukocyte and platelet count were determined on a XT-1800i (Sysmex). Differential blood count was determined by microscopic method in stained blood peripheral smear. Data were analyzed using the Medcalc software. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results: The median concentrations of PCT were 1.32 (range: 0.13-7.37) ng/mL in group A and 0.21 (range: 0.05-9.07) ng/mL in group B and differences between groups were statistically significant ($P = 0.038$). A significantly higher median platelet count ($P = 0.012$) was found in group B (327, range: $40-325 \times 10^9/L$) as compared to group A (140, range: $40-325 \times 10^9/L$). In contrast, median values of CRP, leukocyte and non-segment neutrophile were not significantly different between groups ($P = 0.071$; $P = 0.189$; $P = 0.239$, respectively).

lesnika sa sistemskom bakterijskom infekcijom doprinose poboljšanoj stratifikaciji bolesnika s rizikom nastanka težih komplikacija.

e-pošta: marpavic@yahoo.com

Conclusion: According to obtained results, higher PCT concentrations combined with lower platelet counts in patients with systemic bacterial infection contribute to an improved stratification of patients at risk to develop major complications.

e-mail: marpavic@yahoo.com

P14-2

Prikaz slučaja: vrijednost određivanja serumskog prokalcitonina u praćenju dojenačke sepse komplicirane zatajenjem jetre

Milić M¹, Berecki I², Šerić V¹

¹Odjel za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Klinička bolnica Osijek, Osijek

²Klinika za pedijatriju, Klinička bolnica Osijek, Osijek

Uvod: Prokalcitonin je prekursor hormona kalcitonina koji se stvara se u C-stanicama štitnjače, ali kod bakterijskih infekcija pojačano se eksprimira u svim tkivima i koncentracije prokalcitonina u krvi višestruko rastu. CRP je reaktant akutne faze koji se stvara u jetri. Prokalcitonin je u odnosu na CRP osjetljiviji i specifičniji biljeg teške bakterijske upale.

Materijali i metode: Prokalcitonin je određen na uređaju Vidas Biomerieux. CRP, AST, ALT su određeni na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU 400. Kompletan krvna slika izbrojana je na hematološkom brojaču Sysmex SF-3000. Koagulacijske pretrage načinjene su na analizatoru BCT tvrtke Siemens sa njihovim reagensima.

Rezultati: Dojenče staro dva mjeseca primljeno je s kliničkim i laboratorijskim znakovima septičkog šoka praćenog diseminiranom intravaskularnom koagulacijom uz akutnu hepatalnu insuficijenciju, te s krvarenjem u gastrointestinalni trakt s posljedičnom anemijom. Vrijednosti učinjenih analiza bili su slijedeći: leukociti 40,3 x 10⁹/L, CRP 0,7 mg/L, prokalcitonin 17,0 ng/mL, D-dimeri 1627 ug/L, fibrinogen 0,5 g/L, PV udjel 0,14, aPTV omjer 3,48, AST 475 U/L, ALT 68 U/L.

Zaključak: Serumski prokalcitonin se pokazao kao vrijedna i korisna pretraga jer je korelirao sa septičnim stanjem, dok je CRP ostao unutar referentnog intervala zbog insuficijencije jetre.

e-pošta: milic.marija@kbo.hr

P14-2

Case report: usefulness of procalcitonin in infant sepsis complicated with liver failure

Milić M¹, Berecki I², Šerić V¹

¹Department for Clinical Laboratory Diagnostics, Osijek University Hospital, Osijek, Croatia

²University Department of Pediatrics, Osijek University Hospital, Osijek, Croatia

Introduction: Procalcitonin is a precursor of hormone calcitonin produced by the C-cells of the thyroid gland. Bacterial infections increase its expression in all cell types and circulating levels of procalcitonin increase up to several thousand-fold. CRP is an acute-phase protein released by the liver. Procalcitonin is more sensitive and specific marker than CRP for severe bacterial infection.

Materials and methods: Procalcitonin was determined by Vidas Biomerieux. CRP, AST, ALT was determined by biochemistry analyzer Olympus AU 400. Complete blood count was determined by hematology analyzer Sysmex SF3000 and coagulation parameters by coagulation analyzer BCT Siemens and Siemens reagents.

Results: Two months old infant was hospitalized with clinical and laboratory signs of septic shock, disseminated intravascular coagulation, acute liver failure and hemorrhage in the gastrointestinal tract with consequent anemia. Results of laboratory analysis were: WBC 40.3 x 10⁹/L, CRP 0.7 mg/L, procalcitonin 17.0 ng/mL, D-dimeri 1627 ug/L, fibrinogen 0.5 g/L, PT 0.14, aPTT 3.48, AST 475 U/L, ALT 68 U/L.

Conclusion: Procalcitonin proved as useful and valuable parameter as it correlated with septic condition, while CRP was within reference interval because of liver failure.

e-mail: milic.marija@kbo.hr

P14-3

Uspješnost novog nastavnog plana kolegija "Statistike" Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Petrovečki M^{1,2}, Bilić-Zulle L^{2,3}, Šimundić AM^{2,4}, Nikolac N^{2,4}

¹Klinička bolnica Dubrava, Zagreb

²Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

³Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka

⁴Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Uvod: Akademske god. 2008./09. obnovljena je nastava kolegija „Statistike“ na prvoj godini studija FBF (oba studija, Farmacija i Medicinska biokemija). Kolegij sadrži trideset sati, osam predavanja i sedam seminara u dvostrukom školskom satu. Zajedno s ispitom, program nastave je u najvećem dijelu prilagođen gradivu udžbenika Essential Statistics for the Pharmaceutical Sciences Philipa Rowea (Wiley, 2007).

Postupci: Uspješnost kolegija procijenjena je anketiranjem studenata na završnom predavanju, i to ocjenjivanjem organizacije i sadržaja nastave (ocjene 1–5) i pitanjima znanja, te ispitnom ocjenom. Od ukupno 183, anketu je ispunilo 135 studenata, a ispitu su pristupila 142 studenata (I. ispitno razdoblje). Rezultati su iskazani prosječnim vrijednostima (aritmetička sredina, standardna devijacija) i udjelima.

Rezultati: Studije FBF upisali su učenici s visokom prosječnom srednjoškolskom ocjenom $4,90 \pm 0,31$. Anketom su iskazali očekivanu ispitnu ocjenu $3,67 \pm 0,83$ ($N = 135$), a na ispitu je ostvarena ocjena bila statistički značajno bolja, $4,19 \pm 1,07$ ($N = 145$, $P < 0,001$). Organizacija nastave „Statistike“ ocijenjena je s $4,48 \pm 0,66$ (značajno bolja prema ocjeni organizacije nastave svih ostalih kolegija prvog semestra: $2,39 \pm 0,78$, $P < 0,001$), a zanimljivost nastavnih sadržaja s $3,89 \pm 0,94$ (značajno bolje prema svim ostalim kolegijima prvog semestra: $3,26 \pm 0,75$, $P < 0,001$). Vlastito znanje usvojeno tijekom nastave studenti ocjenjuju s $3,18 \pm 0,69$, ali na četiri probna statistička pitanja s ponuđenim odgovorima u anketi točno odgovaraju redom: 52% (pitanje o standardnoj devijaciji), 90% (uzorak), 99% (povezanost podataka) i 100% (nasumični odabir). Na slična pitanja većina studenata na prvom (uvodnom) predavanju ne zna odgovoriti, tj. jasno u raspravi iskazuje nepoznavanje temeljnih biostatističkih pojmova.

Zaključak: Rezultati potvrđuju dobru organizaciju nastave i primjerenu zanimljivost sadržaja kolegija.

e-pošta: mp@kdb.hrr

P14-3

Evaluation of "Statistics" Curriculum at the Zagreb University School of Pharmacy and Medical Biochemistry

Petrovečki M^{1,2}, Bilić-Zulle L^{2,3}, Šimundić AM^{2,4}, Nikolac N^{2,4}

¹Dubrava Clinical Hospital, Zagreb, Croatia

²Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

³Rijeka Clinical Hospital Center, Rijeka, Croatia

⁴Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Introduction: "Statistics" reformed curriculum was introduced to first year students of the Zagreb University School of Pharmacy and Medical Biochemistry (PMB) during the 2008/09 academic year. The content of curriculum and final exam follows textbook Essential Statistics for the Pharmaceutical Sciences by Philip Rowe (Wiley, 2007).

Methods: Evaluation of curriculum was estimated using anonymous questionnaire filled out by students after the last class. Questionnaire consisted of questions regarding organization and content of curriculum (marked 1-5) and comprehensive questions. Final exam marks were collected. Out of 183 students, 135 filled out the questionnaire and 142 took the exam. Results are presented as mean and standard deviation.

Results: Students enrolled PBM had high marks at high school (4.90 ± 0.31). They expected statistically lower exam mark (3.67 ± 0.83 , $N = 135$) comparing to their real achievement at the exam (4.19 ± 1.07 , $N = 145$, $P < 0.001$). Organization of curriculum was highly appreciated between students (4.48 ± 0.66) with significantly higher grade than organization of all other curricula (2.39 ± 0.78 , $P < 0.001$). The interest for curriculum contents was also graded higher for Statistics (3.89 ± 0.94) than for all other curricula (3.26 ± 0.75 , $P < 0.001$). Student's knowledge gained through classes was self evaluated as 3.18 ± 0.69 , but when answering four multiple choice comprehensive questions the rate of correct answers were as follows: 52% (regarding standard deviation), 90% (regarding sampling), 99% (regarding correlation) and 100% (regarding randomization). Similar question, asked at the first class remained unanswered, i.e., before Statistics classes students didn't recognize basic statistical terms.

Conclusion: Results revealed good organization and achievement of proper interest for curriculum content among students.

e-mail: mp@kdb.h

P14-4

Otkrivanje Pompeove bolesti mjerenjem aktivnosti enzima iz uzoraka suhe kapi krvi na filtar papiru

Bilić K, Fumić K, Čvorišćec D

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Uvod: Pompeova bolest je autosomno recesivni poremećaj metabolizma glikogena koji nastaje radi nedostatka lizosomskog enzima kisele alfa-glukozidaze (GAA). Prekomjerno nakupljanje glikogena u različitim tkivima dovodi do oštećenja stanice, sa povećanjem i trajnim oštećenjem funkcije zahvaćenih organa. Velika raznolikost kliničke slike uvjetovana je vremenom početka bolesti, brzinom napredovanja bolesti i stupnjem zahvaćenosti pojedinih organa. Prema početnim kliničkim simptomima razlikujemo infantilni, juvenilni i adultni oblik Pompeove bolesti. Progresivna hipertrofična kardiomiopatija i izražena slabost mišića su karakteristična obilježja infantilnog oblika. Kasni, adultni i juvenilni oblici bolesti sporije napreduju i očituju se propadanjem skeletne muskulature i zatajenjem dišnog sustava u uznapredovalom stadiju. Kako je od nedavno moguće enzimsko nadomjesno liječenje humanom rekombinantnom alfa-glukozidazom, probir na ovu bolest i rana intervencija mogu značajno poboljšati ishod. Postavljanje dijagnoze mjerenjem aktivnosti enzima u krvi nije uobičajeno u upotrebi radi prisutnosti GAA izoenzima maltaze-glukoamilaze koja značajno interferira pri određivanju lizosomske alfa-glukozidaze (preklapanje aktivnosti) u kiselom PH području. Nedavno su opisane nove enzimatske metode koje mjere GAA aktivnost u suhoj kapi krvi i uklanjaju aktivnost maltaze-glukoamilaze primjenom specifičnog inhibitora-akarboze.

Metode: Mi smo ispitali fluorometrijsku enzimsku analizu u kojoj smo upotrijebili 8 mM akarbozu u kiselim uvjetima (pH 3,8), 10 mM supstrat 4-MU-alfa-D-glukopiranozid i uzorke suhe kapi krvi. Također je mjerena aktivnost referentnog enzima da bi se provjerila kvaliteta uzorka. Kod nalaza snižene enzimatske aktivnosti koji je upućivao na Pompeovu bolest, zatražen je drugi uzorak (novi DBS i limfociti).

Rezultati: Rezultati ispitivanja ukazuju na dijagnostičku učinkovitost ove pretrage jer su bolesnici sa infantilnim i adultnim oblikom bolesti razlučeni od zdravih ispitanika (kontrola).

Zaključak: U zaključku, fluorometrijska DBS enzimaska analiza sa akarbozom se može uspješno koristiti kao metoda prvog probira kod sumnje na Pompeovu bolest.

e-pošta: karmen.bilic@zg.t-com.hr

P14-4

Enzyme assay on dried blood filter paper samples for detection of Pompe disease

Bilić K, Fumić K, Čvorišćec D

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of Medicine and Clinical Hospital Center, Zagreb, Croatia

Introduction: Pompe disease is an autosomal recessive disorder of glycogen metabolism caused by a deficiency of the lysosomal enzyme acid alpha-glucosidase (GAA). Abnormal storage of glycogen in different tissues leads to cellular injury, with enlargement and dysfunction of the involved organs. Broad clinical spectrum varies with respect to age at onset, rate of disease progression and extent of organ involvement. Three types of Pompe disease are recognised: infantile, juvenile and adult-onset. Progressive hypertrophic cardiomyopathy and marked muscle weakness are typical for the infantile type. The slowly progressive adult type and juvenile type present with skeletal muscle weakness and respiratory failure. As enzyme replacement therapy (recombinant human alpha-glucosidase) has recently become available, screening for this disorder and early intervention may significantly improve the outcome. Enzymatic diagnosis in blood is not usually used due to the presence of GAA isoenzyme maltase-glucoamylase which shows a significant overlap in activity within the acidic pH range. Recently, novel enzymatic methods have been described that measure GAA activity in dried blood spot (DBS) and eliminate the maltase-glucoamylase activity by the use of the specific inhibitor acarbose.

Methods: We tested a fluorometric enzyme assay using 8 mM acarbose at pH 3.8, 10 mM substrate 4-MU-alpha-D-glucopyranoside and DBS samples. The activity of a reference enzyme was also measured to confirm the quality of the sample. In suspected cases of Pompe disease, a second sample was requested (new DBS and lymphocytes).

Results: As a result, patients with infantile and adult types of Pompe disease were discriminated from healthy controls.

Conclusion: In summary, the fluorometric DBS enzyme assay using inhibitor acarbose can be successfully used for screening.

e-mail: karmen.bilic@zg.t-com.hr

P14-5

Harmonizacija referentnih intervala za koncentraciju kreatinina u serumu

Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Kardum Paro MM,
Ožvald I, Šimonović B, Sikirica M

Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

Uvod: Referentni intervali za koncentraciju kreatinina u serumu određeni su na reprezentativnom uzorku zdravih osoba za Hrvatsku populaciju (2246 odraslih i 998 djece u dobi od 8-70 godina) Jaffe-ovom kinetičkom metodom. U svrhu harmonizacije referentnih intervala Hrvatska komora medicinskih biokemičara je u siječnju 2005. g., preporučila obveznu primjenu jedinstvenih referentnih intervala za sve laboratorije koji koriste istu preporučenu metodu. Podaci nacionalne vanjske procjene kvalitete oko 200 medicinsko-biokemijskih laboratorija učesnika pokazali su za koncentracije kreatinina prosječni KV od 4,3% do 6,2%, ali su nacionalni rezultati u okviru Međunarodnog projekta IMEP-17, pokazali značajan pozitivan bias iskazan u odnosu na koncentraciju kreatinina u certificiranom referentnom materijalu.

Cilj: Obzirom na sve veće zahtjeve za uvođenjem točnih i specifičnih dijagnostičkih pretraga i njihove sljedivosti do referentnih materijala i metoda, svrha rada bila je evaluacija referentnih intervala za određivanje koncentracije kreatinina u serumu primjenom specifične enzimске metode.

Ispitanici i metode: Referentna grupa sastojala se od 240 *a priori* odabranih zdravih odraslih osoba. Koncentracije kreatinina određivane su Jaffe-ovom kinetičkom metodom i enzimskom metodom na Olympus AU 600 analizatoru uz kalibrator sljedi do IDMS metode i NIST SRM 967 standarda.

Rezultati: Referentni intervali određeni enzimskom metodom koji obuhvaćaju centralnu 0,95 frakciju referentne distribucije bili su u intervalu od 54 do 107 $\mu\text{mol/L}$ za muškarce i 50 do 93 $\mu\text{mol/L}$ za žene u odnosu na IFCC preporučene zajedničke referentne intervale od 64 do 104 $\mu\text{mol/L}$ za muškarce i 49 do 90 $\mu\text{mol/L}$ za žene.

Zaključak: U okviru globalnih aktivnosti u područje harmonizacije u kliničkoj kemiji temeljene na sljedivosti laboratorijskih metoda, evaluacija referentnih intervala za koncentraciju kreatinina u serumu primjenom specifične enzimске metode, sljede do referentne IDMS metode, pokazala je da se tako izrađeni zajednički referentni intervali koje preporučuje IFCC odbor za referentne intervale, mogu primijeniti i na Hrvatsku populaciju.

e-pošta: zлата.mestric@zg.t-com.hr

P14-5

Harmonization of reference intervals for serum creatinine concentrations

Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Kardum Paro MM,
Ožvald I, Šimonović B, Sikirica M

Institute of Clinical Chemistry, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia

Background: Reference intervals for the serum creatinine concentrations were determined on the representative reference sample group of Croatian population (2246 adults and 998 children, age 8-70 years) using Jaffe kinetic method. In order to harmonize the laboratory results the Croatian Chamber of Medical Biochemists recommended obligatory use of the obtained reference intervals for all laboratories using the same analytical method since January, 2005. A review of long-term results collected on national external quality assessment surveys has shown that serum creatinine concentration in almost 200 medical-biochemistry laboratories were determined with average CV between of 4.3% to 6.2%, but in 2002, according to the International Measurement Evaluation program (IMEP-17) our national results for the creatinin concentrations showed significant positive bias to the IDMS certified reference materials.

Aim: Due to the growing requirement for accurate and specific diagnostic tests and their traceability to reference methods we evaluate the reference intervals for creatinine concentrations using accurate and specific enzymatic method.

Methods: The reference sample group consisted of 240 *a priori* selected healthy adults. Serum creatinine concentrations were measured by the kinetic Jaffe method and by an enzymatic assay traceable to the IDMS method on the Olympus AU 600 Analyzer. The manufacturer's calibrator traceable to the IDMS method and NIST SRM 967 was used.

Results: The reference intervals (central 95th percentiles) obtained with Creatinine Enzymatic assay ranged from 54 to 107 $\mu\text{mol/L}$ for males and from 50 to 93 $\mu\text{mol/L}$ for females vs. IFCC recommended reference intervals: 64-104 and 49-90 $\mu\text{mol/L}$ for males and females, respectively.

Conclusions: In accordance with an ongoing activity for worldwide harmonization based on traceability in laboratory methods evaluation of the reference intervals using enzymatic creatinine determinations traceable to the IDMS method in our study showed that recommended reference intervals for global application as proposed by the IFCC Committee on Reference Intervals, and Decision Limits, could be adopted for the Croatian population.

e-mail: zлата.mestric@zg.t-com.hr

P14-6

Vrijednosti procalcitonina i „klasičnih“ biljega u neonatalnoj sepsi: Prikaz slučaja

Garilović J, Škorvaga S, Šimić-Vojak S

Opća županijska bolnica Požega, Požega

Uvod: Procalcitonin (PCT) je relativno noviji biokemijski biljeg za rano prepoznavanje i potvrdu dijagnoze sepsa. Višekratno određivanje pomaže u procjeni učinkovitosti antibiotske terapije i ishoda bolesti. „Klasični“ biljezi obuhvaćaju određivanje kompletne krvne slike, omjera nesegmentiranih i segmentiranih neutrofilnih granulocita (I/M), % nesegmentiranih neutrofilnih granulocita i C-reaktivni protein (CRP).

Materijali i metode: PCT smo odredili u serumu, na aparatu Roche Elecsys 2010, metodom elektrokemiluminiscencije, CRP (visoke osjetljivosti) u serumu na aparatu Olympus AU 400 metodom imunoturbidimetrije. Kompletne krvne slike određene su na automatskom hematološkom brojaču Abbott Cell-Dyn 1700, a diferencijalna krvna slika (DKS) mikroskopskom metodom u obojenom razmazu periferne krvi. Novorođenčetu su određene vrijednosti PCT, CRP, KKS, I/M, % nesegmentiranih neutrofilnih granulocita drugog, petog, šestog i jedanaestog dana života.

Rezultati: Vrijednost PCT je već pri prvom mjerenju bila povišena (2,69 ng/mL), dok su vrijednosti CRP (1,2 mg/L), WBC ($17,7 \times 10^9/L$), I/M (0,018) te % nesegmentiranih neutrofilnih granulocita (1%) bile u rasponu očekivanom za tu dob. Iduće mjerenje (5. dan) pokazalo je porast vrijednosti PCT (21,0 ng/mL), CRP (30,4 mg/L), WBC ($29,3 \times 10^9/L$), I/M (0,17), % nesegmentiranih neutrofilnih granulocita (12). Sljedeća mjerenja (6. i 11. dana) pokazuju pad vrijednosti navedenih biljega i njihovo vraćanje u normalu. Rezultati ukazuju na osjetljivost PCT koji je prvi reagirao na infekciju koja se razvila u sepsi u odnosu na CRP i ostale biljege. **Zaključak:** Učinkovitom antibiotskom terapijom došlo je do normaliziranja stanja što pokazuju vrijednosti svih biljega.

e-pošta: jasna.garilovic@po.t-com.hr

P14-6

Values of procalcitonin and „classic“ markers in neonatal sepsis: Case report

Garilović J, Škorvaga S, Šimić-Vojak S

Požega General Hospital, Požega, Croatia

Introduction: Procalcitonin (PCT) is the newest biomarker for early recognition and diagnosis of sepsis. Determination of PCT helps in making clinical decisions for appropriate antibiotic therapy. „Classic“ markers include determination of these parameters: complete blood count, immature to mature ratio (I/M ratio), percentage of band cells and C-reactive protein (CRP).

Materials and methods: PCT concentration was determined in serum on Elecsys 2010 Roche analyzer, method of electrochemiluminescence. CRP was determined in serum on Olympus AU 400 analyzer (high sensitive application). Complete blood cell count was determined on automated blood counter Abbott Cell-Dyn 1700 and differential blood count was determined by microscopic method in stained peripheral blood smear. We measured concentration of CRP, PCT, WBC, I/M ratio and percentage of band cells on days 2, 5, 6 and 11.

Results: During the first measuring (on day 2) concentration of PCT (2.69 ng/mL) was higher, while the values of CRP, WBC, I/M ratio and % band cells were in range. On day 5 of newborns life for all study parameters were found increased values: PCT (21.0 ng/mL), CRP (30.4 mg/L), WBC ($29.3 \times 10^9/L$), I/M ratio (0.17), % band cells (12). Next measurements (on days 6 and 11) recorded decrease in values of investigated markers and their return to normal. Results show that PCT has the highest diagnostic accuracy among studying biomarkers. PCT levels rise rapidly after infections insult and in sepsis.

Conclusion: Using appropriate antibiotic therapy values of all biomarkers return to normal.

e-mail: jasna.garilovic@po.t-com.hr

Auspices



The 9th EFCC Continuous
Postgraduate Course in Clinical Chemistry

NEW TRENDS IN CLASSIFICATION, DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF THYROID DISEASES

Dubrovnik, October 24-25, 2009, Croatia



European Federation
of Clinical Chemistry
and Laboratory Medicine



Croatian Society of
Medical Biochemists



SLOVENSKO ZDRUŽENJE
ZA KLINIČNO KEMIJO

Slovenian Association
for Clinical Chemistry



For all participants registration desk will be open in
Inter-University Centre Dubrovnik,
Don Frana Bulića 4
Saturday, October 24, from 8:15 to 9:00



Inter-University Centre
Dubrovnik

REGISTRATION FORM

The 9th EFCC Continuous Postgraduate Course in Clinical Chemistry

NEW TRENDS IN CLASSIFICATION, DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF THYROID DISEASES

/Please return to sanda.berzenji@gmail.com/

PLEASE COMPLETE IN BLOCK CAPITALS

Surname _____ First name _____

Address _____

Post Code _____ City _____

Country _____ Phone _____

Fax _____ E-mail _____

Date of arrival _____ 2009. No. of nights _____

Date of departure _____ 2009. Signature _____

There is a number of rooms in Hotel Lero available at special rates for participants of 9th EFCC Course. Rates are daily per room, including breakfast and taxes. Reservations will be made directly with the hotel and on a first-come, first-serve basis. When making room reservation in Hotel Lero it is necessary to mention your participation on the 9th EFCC Course.

We kindly ask you to make your reservation with hotel and to send this form to Sanda Berzenji to fax: +385 1 4828 133 or mail: sanda.berzenji@gmail.com



Odgovor na laboratorijske izazove današnjice i budućnosti.

Inovacije i rješenja koja nudi Roche.

Smanjena složenost i brži rezultati

Konsolidacija širokom ponudom parametara, jednim izvorom nabave i konceptom platforme instrumenata značajno smanjuje troškove i pomaže optimizaciji radnoga postupka

COBAS, COBAS C, COBAS E, MODULAR and LIFE NEEDS ANSWERS are trademarks of Roche.

© 2009 Roche
Roche Diagnostics Ltd., CH-6343 Rotkreuz, Switzerland
www.roche.com



cobas[®]
Life needs answers

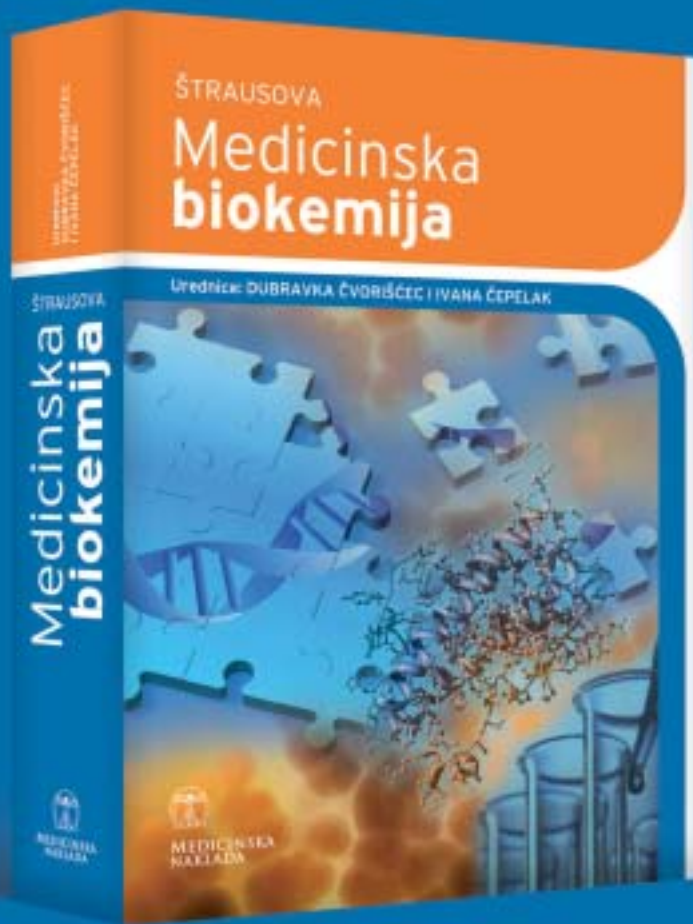


MEDICINSKA
NAKLADA

ŠTRAUSOVA

Medicinska biokemija

Urednice: DUBRAVKA ČVORIŠĆEC i IVANA ČEPELAK



U suradnji s glavnim autorom prof. dr. sc. Božidarom Štrausom, u ovom su izdanju Medicinske biokemije načinjene značajne promjene, kao odgovor na zahtjeve struke, studenata i nastavnika. Ovo, treće izdanje temeljito je prerađeno - sadržava samo relevantne pretrage (zastarjelo gradivo je izostavljeno) i, osim u iznimnim slučajevima, ne sadržava protokole (popis kemikalija, upute za izradu reagensa, postupke određivanja, načine izračunavanja koncentracija ili katalitičkih aktivnosti itd.) određivanja pojedinih analita. Budući da je struka usvojila preporučene analitičke metode za određivanje klinički relevantnih pretraga iz područja medicinske biokemije i da je danas gotovo 90% postupaka automatizirano, detaljni su protokoli izostavljeni zbog različitosti laboratorijske opreme i komercijalnih, gotovih testova koji se danas rabe u laboratorijima. U ovom su udžbeniku prikazani samo protokoli za one analite koji još uvijek nisu postavljeni za automatsko određivanje. Ovo je izdanje i prošireno s ukupno 9 novih poglavlja. U 1. dijelu to su: Uvodni dio, Automatizacija i informatizacija u laboratoriju te Pretrage uz bolesnika; u 2. dijelu udžbenika to su: Citokini i citokinski receptori te u 3. dijelu: Funkcija koštanoga sustava, Funkcija srca, Molekularna dijagnostika i Slobodni radikali i antioksidansi, a napisano je i novo poglavlje: Nasljedni metabolički poremećaji.

Veći broj korisnih podataka priređen je u obliku 19 tablica i nalazi se na kraju knjige u poglavlju Prilozi kao dodatak udžbeniku u elektronskoj verziji (CD).

Štrausova Medicinska biokemija odražava noviju, različitu stručno-znanstvenu i tehnološku prirodu trenutne prakse laboratorijske medicine, područja kliničke biokemije.

cijena knjige: 700,00 kn | broj stranica: 762 | format: 210x270 mm | tvrdi uvez



Odaberite križićem i upišite potrebne podatke

☐ Naručujem knjigu **Štrausova Medicinska biokemija**.

Broj primjeraka: ☐☐☐

Način plaćanja

☐ **Kartica**

datum isteka:

naziv:

broj:

☐ **Opća
uplatnica**

☐ **Virmanom** po ispostavljenom računu
(vrijedi samo za pravne osobe)

Ime i prezime:

Ustanova:

Ulica i broj:

Broj pošte:

Grad:

Država:

E-mail:

Telefon/Fax:

Potpis:

Datum:

Ispunjenu i ovjerenu narudžbenicu možete poslati i faksom: +385 1 3907 041.

MEDICINSKA NAKLADA d.o.o., Cankarova 13, HR-10000 Zagreb, tel.: +385 1 3779 444 / 3779 450, fax: +385 1 3907 041
eMail: prodaja@medicinskanaklada.hr, www.medicinskanaklada.hr

A&B
Abbott
B.I.G. B.L.U.E..
Beckman Coulter
Biognost
Biomedica Medizinprodukte
Diagnostica Skalpeli
Epruveta
GODAX TEHNOLOGIJE
Gorea plus
Greiner Bioline
HKO
Horiba
Hospitalija trgovina
Iason Zagreb
LabEna
LKB
Maritim
Medical intertrade
Medicina-promet
Medicinska naklada
Medico inženjering
Medika
Meditrade H
MES
OktalPharma
Phoenix Farmacija
Roche Diagnostics
Siemens
SIMON
Sole mark
Ventus Medical

A

Alpeza-Viman I, S171
Aralica M, S128

B

Badža N, S158
Bakliža A, S166
Barbarić I, S128
Barišić K, S44
Beljan B, S145
Berecki I, S174
Bernt Živković T, S116
Biasucci LM, S69
Bilić K, S176
Bilić-Zulle L, S53, S54,
S125, S129, S167, S175
Bilopavlović N, S134, S160
Bilušić M, S113
Blaton V, S14
Bokulić A, S150
Borovečki F, S45
Bošnjak N, S118
Božičević S, S93
Božina N, S27, S30, S137
Brečević L, S138
Bronić A, S173
Bukovec Megla Ž, S130,
S131, S145
Buljanović V, S107
Butković-Soldo S, S108

C

Canki-Klain N, S46
Cetina N, S114, S144
Challand G, S50
Christenson RH, S71, S77
Coen Herak D, S64, S112,
S117, S119, S121

Č

Čepelak I, S97, S168,
S169, S170, S172
Čepić K, S109, S132
Čipak A, S106, S141
Čolić-Cvrlje V, S57, S127
Čuković-Čavka S, S137
Čvorišćec D, S157, S176

Ć

Ćorić J, S108, S164

D

Debeljak Ž, S153
Detel D, S172

Dobrošević B, S144, S147
Dodig S, S24, S112
Doljanin Z, S158
Dominis M, S147
Dorner S, S138
Dršata J, S98
Dujmov I, S109, S132
Dvornik Š, S72, S156

DŽ

Džaja N, S150

Đ

Đerek L, S123, S148, S162
Đurić K, S92, S169

F

Ferenec-Ružić D, S105, S126
Fijačko M, S144, S147
Fijačko V, S144
Fišić E, S75, S125, S129, S167
Flegar-Meštrić Z, S35,
S94, S147, S154,
S163, S177
Frakin-Užović I, S126, S1555
Franić Šimić I, S139
Franić Z, S32
Frank S, S131
Fumić K, S80, S176
Futač D, S161

G

Galetović A, S134, S160
Galez D, S157
Galjanić S, S32
Garilović J, S178
Gašljević V, S87
Getaldić B, S145, S161
Gojčeta K, S122
Golubić-Čepulić B, S55, S122
Grahovac B, S48
Granić P, S86
Grdić Rajković M, S170
Grdovic D, S156

H

Hajnšek S, S30
Hasić S, S108, S110
Hefti U, S9
Honović L, S53, S54,
S115, S120, S124, S159
Horvat I, S136, S143
Horvat V, S108, S153
Horvath AR, S11
Hrabrić Vlah S, S156

Huber A, S9
Humar I, S127
Huskić J, S108

J

Jadrić R, S108, S110, S164
Jakić-Razumović J, S151
Jakšić B, S38, S140
Jelisavac Ćosić S, S151
Jurasović J, S124
Jurčić-Karlović E, S158
Juretić D, S35, S89, S91,
S92, S93, S94, S95
Juriček J, S123
Juričić G, S159
Juričić Lj, S127
Jurić S, S108
Justinić D, S141

K

Kačkov S, S113
Kajinić D, S122
Kardum Paro MM, S140,
S147, S177
Kardum-Skelin I, S147
Kelečić J, S56
Kiseljaković E, S108, S110
Klasić A, S145
Kocman B, S127
Koszegi T, S100
Kovacs GL, S15
Kovač Z, S151
Kozić-Dokmanović
S, S145
Kozmar A, S146
Kozić I, S164, S165
Krajnović-Tomašić V, S149
Kralik Oguić S, S79,
S116, S131
Krilić D, S130
Kristek J, S144
Krpan R, S130
Krzrnarić Ž, S137
Kulić A, S19, S151
Kušec R, S142
Kušec V, S135
Kutnjak V, S122
Kvaternik M, S105, S161

L

Ladić A, S137
Laškaj R, S124
Lauć G, S138
Leniček Krleža J, S112

Liehr T, S138
Livun A, S142
Lovrić M, S30

LJ

Ljubić H, S111

M

Maglić L, S34
Majetić-Cetina N, S108,
S147, S153
Makar-Aušperger K, S27
Malenica B, S18, S146
Mandić D, S108, S153
Mandić S, S108, S153
Marc J, S99
Margetić S, S67
Marijančević D, S123, S148
Marout J, S130
Martić A, S152
Marušić Vrsalović M, S142
Matica J, S128
Matišić D, S22, S121, S157
Matijević R, S78
Meniga D, S152
Mihanović M, S166
Miler M, S105
Milevoj Kopčinović L, S173
Milić M, S114, S174
Miloš M, S112, S117,
S119, S121
Mladina B, S109, S132
Mujagić R, S115, S120,
S124, S126, S155, S161
Müller M, S13, S143
Muszbek L, S62

N

Nazor A, S89
Nestić M, S153
Nikolac N, S29, S53,
S54, S87, S106,
S113, S141, S175

O

Obuljen J, S126, S155
Oršolić Lj, S145
Ostojić S, S172
Ožvald I, S60, S154, S177

P

Pamuković D, S152
Pancirov D, S168, S169, S172
Panjeta M, S164

Paradinović K, S114
 Patajac H, S107
 Pauković Sekulić
 B, S118, S160
 Pavela J, S144, S147
 Pavić M, S173
 Pejša V, S142
 Peran N, S152
 Percan M, S120
 Perkov S, S177
 Perović E, S40
 Petek-Tarnik I, S130
 Petlevski R, S102, S131
 Petrovečki M, S107, S175
 Pichler J, S9
 Pipić-Kitter A, S149
 Pirija M, S120
 Pizent A, S126
 Plebani M, S25
 Posavac K, S170
 Posavec Lj, S131
 Puclin G, S170

R

Radić Antolic M, S136, S143
 Radić N, S146
 Radišić Biljak V, S168, S169
 Ravnić R, S159
 Reljić A, S141
 Rnjak L, S146
 Rogić D, S122
 Roje D, S132
 Romić Ž, S123, S142,
 S148, S162
 Rudolf M, S146
 Ruljančić N, S166

Rumenjak V, S164,
 S165, S166
 Rumora L, S170

S

Salamunić I, S21,
 S118, S134, S160
 Samoščanec K, S85
 Sapunar A, S118
 Serdar T, S148, S162
 Sertić D, S143
 Sertić J, S47, S111, S127, S137
 Severinski S, S128
 Sikirica M, S91, S163, S177
 Simon R, S44
 Sirotković-Skerlev M, S151
 Sladić D, S152
 Slavica V, S152
 Sokolić I, S147
 Somborac A, S172
 Sorić J, S169
 Sporiš D, S30
 Stančin N, S162
 Stanišić L, S109, S132
 Stavljenić-Rukavina
 A, S10, S16
 Stipoljev F, S138
 Stjepanović G, S168
 Svržan J, S155

Š

Šegulja D, S171
 Šerić V, S174
 Šiftar Z, S58, S140, S147
 Šimek S, S115, S120
 Šimić-Vojak S, S178

Šimonović B, S177
 Šimundić AM, S49, S53,
 S54, S105, S106, S113,
 S131, S141, S175
 Škaričić A, S146
 Škorvaga S, S178
 Šmalcelj R, S135
 Šprajc N, S162
 Štefanović M, S26,
 S105, S106
 Štifter S, S128
 Šupak Smolčić V, S53,
 S54, S125, S129, S167
 Šupak V,
 Šupe Domić D, S109, S132
 Šurina B, S60, S127, S154

T

Tandara L, S42, S118,
 S133, S134, S160
 Tandara M, S133
 Tešija Kuna A, S20, S155
 Tišlarić-Medenjak D, S131
 Topić E, S105, S124
 Tornow T, S41
 Trbojević-Čepe M, S111
 Trogrlić M, S159

U

Unić A, S123, S148, S162

V

Varljen J, S172
 Vidas Ž, S154
 Vogrinc Ž, S111
 Vrane V, S150

Vrbanc D, S19, S151
 Vrdoljak Gudasić J, S150
 Vrhovac R, S140
 Vrkić N, S74, S105,
 S106, S124, S126,
 S141, S155, S161
 Vucelić B, S137
 Vučić Lovrenčić M, S81, S93
 Vukasović I, S37, S106
 Vukelić N, S161

W

Wagner J, S138
 Weinberger K, S9
 Winterhalter-Jadrić
 M, S108, S110
 Woods T, S66

Z

Zadro R, S112, S117, S119,
 S121, S136, S143
 Zec I, S130, S131
 Zima T, S32
 Zovko V, S171
 Zrinski Topić R, S112
 Zupančić Šalek S, S63

Ž

Žanić Grubišić T, S97,
 S169, S170
 Živković M, S148
 Županić D, S115, S120