

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 anti-neuronska antitijela sastavni su dio dijagnostičkih kriterija na temelju kojih se postavlja „konačna“ ili samo „vjerojatna“ 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 biopatu 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), fluorokemijska (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), fluorokemijska (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 gamapatija

Matišić D

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

Monoklonske gamapatije (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 mukotrorno 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-HAAAs). 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-structuree 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-HAAAs). 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

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 izbjegniju 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-

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: dmatic@kbc-zagreb.hr

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 prolijekovima 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