

PEDIATRIC OBESITY AND ITS ASSOCIATED CO-MORBIDITIES

Edgard Delvin

*Montreal Children's Hospital,
McGill University, Montreal, Canada*

The rapidly increasing prevalence of childhood obesity and its lot of associated co-morbidities have become major public health concerns in developed and developing countries. Hence, it is fairly safe to anticipate in the next decades a major increase of young adults with the stigmata of the metabolic syndrome (MetS), and of its hepatic expression, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) that may lead to nonalcoholic steatohepatitis (NASH). The lecture will introduce the prevalence, secular trends and consequences of obesity, and will provide the fundamentals of the epidemiology and pathophysiology of NAFLD. It will also briefly cover the present biomarkers and the development of new ones.

EPIDEMIOLOGY AND NATURAL HISTORY OF NAFLD

Valerio Nobili

Bambino Gesù Children Hospital, Rome, Italy

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a multifaceted disorder, which ranges from simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) with/without fibrosis. The effects of specific risk factors, such as obesity and sedentary lifestyle, on predisposing genetic settings eventually lead to the development of NAFLD in children. The complex interplay between genes and the environment in NAFLD pathogenesis is sustained by multiple mechanisms that involve liver crosstalk with other organs and tissues, especially gut and adipose tissue. Unfortunately, natural history of pediatric NAFLD is lacking, and the etiopathogenesis is still in the process of being defined. Potential early predictors and suitable noninvasive diagnostic tools can be discovered based on the pathogenetic mechanisms and histological patterns. This will also help design novel treatments and a comprehensive and successful management strategy for the patients.

PEDIJATRIJSKA GOJAZNOST I NJENI KOMORBIDITETI

Edgard Delvin

*Dečija bolnica Montreal,
Univerzitet Mekgil, Montreal, Kanada*

Sve veća učestalost gojaznosti kod dece i ko-morbiditeti koji su s njom povezani postali su veliki zdravstveni problem u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju. Usled toga, u narednim decenijama gotovo sigurno nas očekuje veliki porast broja mladih ljudi sa obeležjima metaboličkog sindroma (MetS) i njegove ekspresije u jetri, odnosno nealkoholne bolesti masne jetre (NABMJ) koja može dovesti do nealkoholnog steatohepatitisa (NASH). Na ovom predavanju biće predstavljena učestalost, sekularni trendovi i posledice gojaznosti, kao i osnove epidemiologije i patofiziologije NABMJ. Biće takođe predstavljeni postojeći biomarkeri, kao i razvoj novih.

EPIDEMIOLOGIJA I PRIRODNA ISTORIJA NEALKOHOLNE MASNE JETRE

Valerio Nobili

Dečija bolnica »Bambino Gesù«, Rim, Italija

Nealkoholna bolest masne jetre (NBMJ) poremećaj je koji može imati više oblika, od proste steatoze pa do nealkoholnog steatohepatitisa (NASH) sa/bez fibroze. Efekti specifičnih faktora rizika, kao što su gojaznost i često sedenje, na predisponirajuće genetske uslove na kraju dovode do razvoja NBMJ kod dece. Složena interakcija gena i okoline u patogenezi NBMJ posledica je rada više mehanizama koji uključuju unakrsna dejstva između jetre i ostalih organa i tkiva, pre svega crevnih i adipoznih tkiva. Nažalost, prirodna istorija pedijatrijske NBMJ nije opisana, dok je njena etiopatogeneza još u procesu definisanja. Potencijalni rani prediktori i pogodna neinvazivna dijagnostička sredstva mogu se otkriti na osnovu patogenetskih mehanizama i histoloških obrazaca. Ovo će takođe pomoći u osmišljavanju novih tretmana i sveobuhvatne i uspešne strategije upravljanja za pacijente.

METABOLIC SETUP AND RISKS IN OBESE CHILDREN

Mirjana Kocova

University Pediatric Clinic, Skopje,
Republic of Macedonia

Obesity is a growing problem around the world with an onset very early in childhood. It affects children of all ages, even infants and babies. Insulin resistance, on the other hand, is among the central events and influences metabolic and cardiovascular complications occurring in obese children. In addition, several hormones which regulate energy metabolism are secreted by adipose tissue, among which adiponectin and leptin are the main adipokines regulating insulin sensitivity. The aim of this study was to present the metabolic setup in obese children and different risks causing morbidity later in life. Several studies in obese children of different ages performed in the Republic of Macedonia are summarized. We have explored insulinemia in 78 obese and overweight children at the age of 13.5+4.1 years with a BMI > 85%. A relative with diabetes, obesity, hyperlipidemia and/or hypertension was detected in 53.6% of patients. BMI was higher in the pubertal group and significantly higher in girls. The only significant metabolic difference between the prepubertal and pubertal groups was the peak insulinemia: 87.361+59.3 U/mL versus 57.9+26.3 U/mL ($p<0.01$). Peak insulinemia is higher in the pubertal group suggesting that the risk for glucose intolerance rises during puberty. Glucose intolerance was found in 24% of the 158 obese children studied. Leptin level in the obese children was 36.1+13.7 ng/mL versus 5.7+1.5 in nonobese children ($p<0.05$). There was a significant correlation between the BMI and leptin ($p<0.01$). Adiponectin levels were 10.5+4.8 ng/mL (average) in obese children and 15.2+6.9 ng/mL in controls ($p<0.05$). There was a significant negative correlation of BMI with the adiponectin levels ($p<0.05$). Our study also confirmed that obese adolescents have a more atherogenic lipoprotein profile, associated with increased insulin resistance (IR). Adiponectin was inversely associated with atherogenic lipoproteins in adolescents, even after adjusting for obesity and IR. In an additional study we compared the values of insulin, adiponectin and leptin between prepubertal and pubertal obese children. We found that insulin resistance increases with age in obese children. Although leptin levels were similar in both groups, low adiponectin levels indicated much higher risk for insulin resistance and cardiovascular complications in older children with obesity. Therefore, therapeutic intervention in obese children should begin at a younger age.

METABOLIČKI SKLOP I RIZICI KOD GOJAZNE DECE

Mirjana Kocova

Univerzitetaska pedijatrijska klinika, Skopje,
Republika Makedonija

Gojaznost je rastući problem širom sveta, a javlja se vrlo rano u detinjstvu. Pogađa decu svih uzrasta, čak i novorođenčad i bebe. S druge strane, insulinska rezistencija spada u glavne događaje i utiče na metaboličke i kardiovaskularne komplikacije koje se javljaju kod gojazne dece. Pored toga, adipozno tkivo luči nekoliko hormona koji regulišu energetske metaboliizam, između ostalih adiponektin i leptin, kao glavne adipokine koji regulišu osetljivost na insulin. Cilj ove studije bio je da predstavi metabolički sklop kod gojazne dece i različite rizike koji izazivaju morbiditet kasnije u životu. Ukratko je predstavljeno nekoliko studija na gojaznoj deci različitih uzrasta izvedenih u Republici Makedoniji. Istraživali smo insulinemiju kod 78 gojazne dece i dece s prekomernom težinom u uzrastu 13,5+4,1 godina sa indeksom telesne mase (ITM) > 85%. Povezanost sa dijabetesom, gojaznošću, hiperlipidemijom i/ili hipertenzijom otkrivena je kod 53,6% pacijenata. ITM je bio viši u grupi pubertetlija i značajno viši kod devojčica. Jedina značajna metabolička razlika između prepubertetske i pubertetske grupe bila je u piku insulinemije: 87,361+59,3 U/mL prema 57,9+26,3 U/mL ($p<0,01$). Pik insulinemije je viši u pubertetskoj grupi, što ukazuje na porast rizika za intoleranciju glukoze tokom puberteta. Intolerancija glukoze nađena je kod 24% od 158 proučavanih gojaznih dečaka i devojčica. Nivo leptina kod gojazne dece bio je 36,1+13,7 ng/mL, prema 5,7+1,5 kod dece koja nisu gojazna ($p<0,05$). Utvrđena je značajna korelacija između ITM i leptina ($p<0,01$). Nivoi adiponektina kod gojazne dece bili su u proseku 10,5+4,8 ng/mL, a 15,2+6,9 ng/mL kod kontrolnih subjekata ($p<0,05$). Pronađena je značajna negativna korelacija između ITM-a i nivoa adiponektina ($p<0,05$). Naša studija je takođe potvrdila da gojazni adolescenti imaju više aterogeni lipoproteinski profil koji je povezan s povećanom insulinskom rezistencijom (IR). Adiponektin je bio u obrnutoj korelaciji sa aterogenim lipoproteinima kod adolescenta, čak i posle prilagođavanja za gojaznost i IR. U dodatnoj studiji uporedili smo vrednosti insulina, adiponektina i leptina između gojazne dece prepubertetskog i pubertetskog uzrasta. Otkrili smo da se insulinska rezistencija s godinama povećava kod gojazne dece. Iako su nivoi leptina bili slični u obe grupe, niski nivoi adiponektina ukazali su na mnogo veći rizik od insulinske rezistencije i kardiovaskularnih komplikacija kod starije gojazne dece. Zbog toga, terapijska intervencija kod gojazne dece treba da počne u ranom uzrastu.

INSULINEMIA IN OBESE CHILDREN INSULINEMIJA U GOJAZNE DECE

Dragan Katanić

Novi Sad, Serbia

(Abstract not received)

THE DIAGNOSIS OF PREDIABETES IN ADOLESCENTS

Vera Zdravković

Children's Hospital, Belgrade, Serbia

In view of the fact that both prediabetes and, more importantly, type 2 diabetes have recently emerged as early complications of childhood obesity, it is of critical importance to diagnose these forms of dysglycemia early in their development. prediabetes is characterized by isolated impaired fasting glucose (IFG), isolated impaired glucose tolerance (IGT), and combined IFG/IGT. The gold standard for assessing insulin sensitivity is the hyperinsulinemic-euglycemic clamp, which measures the *in vivo* rate of insulin-stimulated glucose disposal by the total organism. Due to the costly, labor-intensive, and invasive nature of the method, it is not applicable in large-scale epidemiological studies. Therefore, surrogate indices of insulin sensitivity have been developed [e.g. the homeostasis model assessment (HOMA) and whole-body insulin sensitivity index (WBISI)]. In adults, many surrogate indices across a range of glucose tolerance (including diabetes) and categories of weight status and age have been validated and used extensively in epidemiological studies. However, most pediatric studies have assessed the use of fasting indices only, whereas data on the relative usefulness of oral glucose tolerance test (OGTT)-derived surrogates in pediatrics are lacking. Subsequently, HbA1c diagnostic cutoffs were incorporated into the 2010 American Diabetes Association (ADA) guidelines for diabetes (HbA1c 6.5%) and prediabetes (HbA1c 5.7 to 6.5%). Unlike glycemic measures [e.g., fasting glucose, oral glucose tolerance test (OGTT)], the HbA1c may be performed in the nonfasting state. We will present our group of patients, obese Caucasian adolescents, and discuss the methods we used to diagnose prediabetes.

DIJAGNOZA PREDIJABETESA KOD ADOLESCENATA

Vera Zdravković

Dečija bolnica, Beograd, Srbija

S obzirom na činjenicu da su se nedavno kao rane komplikacije gojaznosti u detinjstvu istakli predijabetes i, što je još važnije, dijabetes tip 2, izuzetno je važno da se ovi oblici disglukemije dijagnostikuju u početnoj fazi njihovog razvoja. Karakteristike predijabetesa su izolovana povišena glikemija natašte, izolovana smanjena tolerancija glukoze ili kombinacija oba. Hiperinsulinemijsko-euglikemijski klamp koji *in vivo* meri stopu insulinom stimulisanog preuzimanja glukoze od strane celog organizma predstavlja zlatni standard u određivanju insulinske osetljivosti. Kao skup, zahtevan i invazivan po svojoj prirodi, ovaj metod nije primenljiv u epidemiološkim studijama velikog formata. Zbog toga su razvijeni surogat indeksi za insulinsku osetljivost [npr. model homeostaze (homeostasis model assessment, HOMA) i indeks insulinske osetljivosti celog tela (whole-body insulin sensitivity index, WBISI)]. Za odrasle su validirani mnogi surogat indeksi za razne nivoe tolerancije glukoze (uključujući dijabetes) i kategorije statusa težine i starosti i oni se široko primenjuju u epidemiološkim studijama. Međutim, većina pedijatrijskih studija ispitivala je samo upotrebu indeksa natašte, dok podaci o relativnoj korisnosti surogata izvedenih na osnovu oralnog testa opterećenjem glukozom (oral glucose tolerance test, OGTT) u pedijatriji ne postoje. Usled toga, Američko udruženje za borbu protiv dijabetesa (American Diabetes Association, ADA) uključilo je 2010. godine dijagnostičke »cut-off« vrednosti za HbA1c u svoje smernice za dijabetes (HbA1c 6,5%) i predijabetes (HbA1c 5,7% do 6,5%). Za razliku od glikemijskih mera (npr. glukoze natašte, oralni test opterećenjem glukozom), test za HbA1c ne mora se raditi natašte. Predstavićemo našu grupu pacijenata, gojaznih adolescenata, i razmotriti metode koje smo koristili u dijagnostikovanju predijabetesa.

DIFFERENT VIEWPOINTS: INTERNATIONAL PERSPECTIVES ON NEWBORN SCREENING

Rodney Pollitt

Sheffield Children's Hospital, Western Bank,
Sheffield S10 2TH, UK

The concept of whole-population newborn screening for treatable metabolic disease has been generally accepted for over fifty years. Starting from the pioneering work of Robert Guthrie on a single disorder, phenylketonuria, the number of disorders that it is possible to screen for has increased steadily, in the last two decades almost exponentially as new technologies have been developed. However, progress has been patchy. In parts of the USA screening covers over 50 individual conditions whilst some European countries with equally well-developed medical systems are screening for four or less. The rationale behind these differences is not always obvious. Policy discussions draw heavily on the ten 'principles' of the Wilson and Jungner paper of 1968 but their relevance to newborn screening requires critical examination. Being largely focussed on adult disease, they neglect the family dimension of newborn screening, particularly the value of genetic information and the way that prompt diagnosis, even of an incurable condition, can ease the family journey. Such considerations underpin the Welsh screening programme for Duchenne muscular dystrophy. Many of the Wilson and Jungner principles are couched in qualitative terms, »the natural history of a condition should be adequately understood«, »there should be a suitable test or examination«, with no clear decision-point as to whether or not these requirements are met. Much depends on who is doing the judging. Clinicians tend to be influenced most by their experiences with individual patients and their families, though this can lead to widely divergent views. Public health specialists and health economists consider policy mainly in terms of its impact on whole populations with emphasis on criteria requiring firm quantitative data. Such requirements are often impossible to fulfill for disorders that are rare, with a range of severity, and a degree of compromise is required. Much depends on the setting. In the USA, where tandem mass spectrometry (MS-MS) has been exploited with great enthusiasm, the role of individual State legislatures in mandating screening panels has made them very susceptible to parental pressure groups. By contrast, in the UK, where policy is shaped largely at the executive rather than the political level, of the many disorders newly accessible by MS-MS only medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency has so far been accepted for the national programme. There are also big national differences

RAZLIČITA GLEDIŠTA: MEĐUNARODNE PERSPEKTIVE U VEZI S TESTIRANJEM NOVOROĐENČADI

Rodney Pollitt

Dečija bolnica u Šefildu, Zapadna obala,
Šefild, Ujedinjeno Kraljevstvo

Koncept testiranja novorođenčadi u čitavoj populaciji na izlečive bolesti metabolizma u načelu je prihvaćen pre više od pedeset godina. Počev od pionirskog rada Roberta Gatrija o jednom poremećaju, fenilketonuriji, broj poremećaja koji se mogu otkriti testiranjem neprestano raste, u posljednje dve decenije gotovo eksponencijalno s razvojem novih tehnologija. Međutim, nije svuda ostvaren isti napredak. U nekim delovima SAD testiranje pokriva preko 50 pojedinačnih stanja, dok se u nekim evropskim zemljama sa jednako dobro razvijenim zdravstvenim sistemima testira na četiri ili manje. Nije uvek jasno koji je razlog za postojanje ovakvih razlika. Diskusije o praksi testiranja uglavnom se pozivaju na deset »principa« navedenih u radu Vilsona i Jungnera iz 1968, ali treba kritički ispitati koliko su oni relevantni za testiranje novorođenčadi. Pošto se većinom fokusiraju na oboljenja odraslih ljudi, ovi principi zanemaruju porodičnu dimenziju testiranja novorođenčadi, naročito vrednost genetskih informacija i način na koji brzo postavljanje dijagnoze, čak i kod neizlečivih stanja, može olakšati teret koji porodica obolelog mora da podnese. Program testiranja na Dišenovu mišićnu distrofiju u Velsu uvažava i navedene problematične aspekte. Mnogi principi Vilsona i Jungnera izraženi su kvalitativnim odrednicama: »treba pravilno razumeti prirodnu istoriju stanja«, »treba da postoji odgovarajući test ili ispitivanje«, ali ne daju jasan odgovor na pitanje da li se ovi zahtevi ispunjavaju ili ne. Ovo umnogome zavisi od toga ko prosuđuje. Na kliničare često najviše utičaju imaju njihova iskustva s pojedinačnim pacijentima i njihovim porodicama, iako to može dovesti do veoma različitih stavova. Specijalisti za javno zdravlje i ekonomisti u zdravstvu praksom testiranja se bave uglavnom u smislu njenog uticaja na čitave populacije, s naglaskom na kriterijume koji zahtevaju pouzdane kvantitativne podatke. Takve zahteve je često nemoguće ispuniti kod retkih poremećaja, koji mogu imati različite nivoe ozbiljnosti, pa je potrebno posegnuti za kompromisom. Mnogo zavisi od okruženja. U SAD, gde se tandemski masena spektrometrija (MS-MS) upotrebljava s velikim entuzijazmom, zahvaljujući ulozi pojedinačnih zakona u nekim državama koji se odnose na obavezne panele za testiranje, grupe roditelja dobile su velika ovlašćenja i moć. Nasuprot tome, u Ujedinjenom Kraljevstvu, gde se praksa uglavnom diktira na izvršnom umesto na političkom nivou, od mnogih poremećaja koji se sada mogu otkriti putem

when it comes to detail, such as cut-offs and treatment thresholds, and a tendency for specificity to be sacrificed in favour of maximising sensitivity, with local variations in practice irrespective of formal national policy. Views on the ethics of newborn screening also differ considerably. Should screening be mandatory? How should consent be obtained and verified? Investigations at the DNA level are a particular sticking point and in some countries are limited by statute law. Some screening protocols for cystic fibrosis are specifically designed to avoid the need to look for mutations of the CFTR gene, others use a limited panel of disease-causing CFTR mutations, thus minimising the number of unaffected carriers detected, while elsewhere almost the entire gene is scanned. Exploratory studies of the potential of genome-wide 'next generation sequencing technology' in newborn screening are already underway. The gap between what is possible and what is practicable or desirable is about to become yet wider.

MS-MS do sada je samo nedostatak acil-CoA dehidrogenaze srednjih lanaca prihvaćen za nacionalni program. Postoje i velike nacionalne razlike u pogledu detalja kao što su *cut-off* vrednosti i prag lečenja, kao i tendencija da se žrtvuje specifičnost nauštrb što veće osetljivosti, s lokalnim varijacijama u praksi nevezanim za formalnu nacionalnu politiku. Stavovi o etičnosti testiranja novorođenčadi se tako znatno razlikuju. Treba li testiranje da bude obavezno? Kako uzeti i potvrditi pristanak? Istrage na nivou DNK su posebno problematične i u nekim zemljama su ograničene statutom. Neki protokoli testiranja za cističnu fibrozu su posebno osmišljeni da se izbegne potreba za traženjem mutacije u genu CFTR, drugi koriste ograničen panel mutacija CFTR koje izazivaju bolest, čime se broj otkrivenih nosilaca koji nisu oboleli smanjuje na minimum, dok se na nekim mestima skenira gotovo čitav gen. Već su započete studije koje istražuju potencijal »tehnologije sekvenciranja sledeće generacije« u čitavom genomu u testiranju novorođenčadi. Jaz koji postoji između onoga što je moguće i onoga što se praktikuje ili je poželjno postaće još veći.

STANDARDIZATION IN NEONATAL SCREENING PROGRAMMES STANDARDIZACIJA NEONATALNIH SCREENING PROGRAMA

Alberto Burlina

Padua, Italy

(Abstract not received)

CFTR MOLECULAR TESTING OF TWO PATIENT COHORTS IN HUNGARY: RELEVANCE TO NEWBORN SCREENING

Gergely Ivády, Katalin Koczok, István Balogh

*Department of Laboratory Medicine,
University of Debrecen, Debrecen, Hungary*

Cystic fibrosis (CF) is the most common severe inherited monogenic disease in Caucasians. In addition to the most frequent Phe508del mutation which is responsible for 50–85% of the cases, more than 1700 different rare mutations are present in the CFTR gene among which less than 20 mutations show large ethnic and geographic variability. Here, we present the mutational spectrum of CF patients

MOLEKULARNO TESTIRANJE GENA CFTR U DVE SKUPINE PACIJENATA U MAĐARSKOJ: RELEVANCIJA ZA TESTIRANJE NOVOROĐENČADI

Gergely Ivády, Katalin Koczok, István Balogh

*Katedra za laboratorijsku medicinu,
Univerzitet u Debrecenu, Debrecen, Mađarska*

Cistična fibroza (CF) najčešće je nasledno teško monogeno oboljenje kod pripadnika evropeidne rase. Pored najčešće mutacije Phe508del koja je odgovorna za 50–85% slučajeva, u genu CFTR prisutno je preko 1700 različitih retkih mutacija, među kojima manje od 20 mutacija pokazuje velike varijacije u odnosu na etničku pripadnost i geografsko poreklo. Ovde ćemo predstaviti spektar mutacija pacijenata sa

from two Hungarian cohorts. In the first, 40 consecutive CF suspect patients from Eastern Hungary were tested using sweat chloride measurement and different mutation detection approaches. First-line molecular testing was performed using the commercially available multiplex allele specific PCR assay which is able to detect 29 mutations in the CFTR gene complemented with a PCR reaction for the detection of CFTRdele2,3(21kb) mutation. Next, Sanger DNA sequencing was used to detect small-scale mutations not present in the commercial assay. Finally, MLPA analysis was used to detect large-scale rearrangements. The commercial assay was able to detect 81.25% of the mutations. The detection rate increased with the detection of CFTRdele 2,3(21kb) mutation by 5% (86.25%). Sequencing of exon 13 resulted in 91.25% detection sensitivity due to the 2184insA mutation, while sequencing of the remaining CFTR exons increased the mutation detection rate to 98.75% (79/80 allele). No other large-scale intragenic rearrangements were found in this group of patients. These results were published in the *Journal of Cystic Fibrosis* (Ivády et al, 2011). In the second cohort, 45 patients were tested from different regions of Hungary (it is to be noted that only patients with two mutations were included in this part of the study). The genetic analysis methodology was essentially the same as above, however, in 10 cases only the second and, if needed, the third level molecular analysis were used as the sending institution had performed the first-line testing. In this group, the commercial assay was able to detect 71.1% of the mutations. The allele-specific PCR for CFTRdele2,3(21kb) increased the detection rate to 75.6%. Sequencing of exon 13 resulted in 84.4% detection sensitivity due to the presence of 2184insA and four other rare mutations. The remaining mutations were scattered throughout the entire coding region of the CFTR gene. One complex mutation affecting a single exon (dele2, c.54-5811_164+2186del273+6780_273+6961inv) was detected by MLPA analysis and was confirmed by PCR and sequencing. In conclusion, the commercial allele specific mutation detection method alone is not sufficient to detect 85–90% of CFTR mutations that would be recommended for the DNA tier of the newborn screening programme. By complementing it with the detection of population-specific mutations (i.e. CFTRdele2,3 (21kb) and 2184insA in Hungary) and MLPA analysis the required sensitivity can be achieved.

CF iz dve skupine mađarskih ispitanika. U prvoj je testirano 40 konsektivnih pacijenata sa sumnjom na CF iz istočne Mađarske, pomoću merenja hlorida u znoju i različitih pristupa za otkrivanje mutacija. Molekularno testiranje prve linije obavljeno je komercijalno dostupnim multipleks PCR testom specifičnim za alele koji otkriva 29 mutacija u genu CFTR, a koji je dopunjen PCR reakcijom za otkrivanje mutacije CFTRdele2,3(21kb). Potom je upotrebljeno Sanger sekvenciranje DNK za otkrivanje mutacija malih razmera koje nisu prisutne u komercijalnom testu. Najzad, analizom MLPA otkriveni su rearanžmani velikih razmera. Komercijalni test uspeo je da otkrije 81,25% mutacija. Stopa detekcije je sa otkrivanjem mutacije CFTRdele2,3(21kb) porasla za 5% (86,25%). Sekvenciranje egzona 13 podiglo je osetljivost detekcije na 91,25% zbog mutacije 2184insA, dok je sekvenciranje preostalih egzona CFTR povećalo stopu detekcije mutacija na 98,75% (79/80 alela). U ovoj grupi pacijenata nisu pronađeni nikakvi drugi rearanžmani velikih razmera u okviru gena. Ovi rezultati objavljeni su u časopisu *Journal of Cystic Fibrosis* (Ivády et al, 2011). U drugoj skupini testirano je 45 pacijenata iz različitih oblasti Mađarske (treba napomenuti da su u ovaj deo studije bili uključeni samo pacijenti sa dve mutacije). Metodologija genetske analize bila je u suštini ista kao i za prethodnu skupinu, međutim, u 10 slučajeva upotrebljena je samo molekularna analiza drugog i, po potrebi, trećeg nivoa, pošto je ustanova-pošiljalac već obavila testiranje prve linije. U ovoj grupi komercijalni test uspeo je da otkrije 71,1% mutacija. PCR specifična za alele za CFTRdele2,3(21kb) povećala je stopu detekcije na 75,6%. Sekvenciranje egzona 13 dalo je osetljivost detekcije od 84,4% zbog prisustva 2184insA i još četiri retke mutacije. Preostale mutacije bile su raspoređene po celom kodirajućem regionu gena CFTR. Složena mutacija prisutna u jednom egzonu (dele2, c.54-5811_164+2186del273+6780_273+6961inv) otkrivena je analizom MLPA i potvrđena pomoću PCR i sekvenciranja. Da zaključimo: komercijalni metod za otkrivanje mutacija specifičnih za alele sam po sebi nije dovoljan za otkrivanje 85–90% mutacija CFTR, koliko se preporučuje za kategoriju DNK u okviru programa testiranja novorođenčadi. Dopunsko otkrivanje mutacija specifičnih za populacije [npr. CFTRdele2,3(21kb) i 2184insA u Mađarskoj] i analiza MLPA učiniće da se postigne potrebna osetljivost.

IMPORTANCE OF SCREENING IN THE PREVENTION OF THALASSEMIA SYNDROMES

Milica Čvorkov-Dražić

Society of Medical Biochemists of Serbia,
Belgrade, Serbia

Thalassemia syndromes represent a heterogeneous group of inherited anemias. Clinical manifestations are diverse, ranging from asymptomatic hypochromia and microcytosis to profound anemia, which is fatal *in utero* or in early childhood if untreated. Thalassemia syndromes comprise thalassemias and hemoglobin variants. Thalassemias are quantitative disorders in which an absence or a decrease in the synthesis of globin polypeptide chains occurs. Hemoglobin variants are characterized by the production of normal amounts of mutant globin chains having deranged physical or chemical properties. Thalassemias represent the most common single gene disorder known. Although they have relatively homogeneous hematological and biochemical parameters, they are the result of a large number of various genetic mutations. Detection of thalassemia begins with the analysis of hematological parameters and usage of specific methods and tests (cellulose acetate and cellogel electrophoresis, determination of HbA₂ and HbF levels, the heat denaturation test). In the Laboratory for Research of Inborn Disorders of Metabolism, during 3 years (2007–2009) 338 patients with microcytosis and hypochromic anemia were tested. In 85 (25.1%) patients we suspected thalassemia A₂, and in 7 (2.07%) Hb Lepore heterozygotes. In cooperation with the Institute for Molecular Genetics and Genetic Engineering, in all patients the diagnosis was confirmed at the molecular level. Pathological hemoglobin detection programme, based on the screening of the suspected population in combination with molecular diagnosis and genetic counsel, represents a safe way for preventing the birth of patients with these diseases.

VAŽNOST TESTIRANJA U PREVENCIJI TALASEMIJSKIH SINDROMA

Milica Čvorkov-Dražić

Društvo medicinskih biohemičara Srbije,
Beograd, Srbija

Talasemijski sindromi predstavljaju heterogenu grupu naslednih anemija. Kliničke manifestacije se razlikuju, od asimptomatične hipohromije i mikroci-toze do teške anemije, koja je *in utero* ili u ranom detinjstvu fatalna ako se ne leči. Talasemijski sindromi uključuju talasemije i varijante hemoglobina. Talasemije su kvantitativni poremećaji u kojima postoji odsustvo ili smanjena sinteza polipeptidnih lanaca globina. Varijante hemoglobina odlikuje proizvodnja normalnih količina mutiranih lanaca globina sa poremećenim fizičkim ili hemijskim svojstvima. Talasemije predstavljaju najčešći poznati poremećaj jednog gena. Iako imaju relativno homogene hemato-loške i biohemijske parametre, one su rezultat velikog broja različitih genetskih mutacija. Otkrivanje talasemije počinje analizom hematoloških parametara i upotrebom specifičnih metoda i testova (celulozni acetat i celogel elektroforeza, određivanje nivoa HbA₂ i HbF, test toplotne denaturacije). U Laboratoriji za istraživanje urođenih poremećaja metabolizma, za tri godine (2007–2009) testirano je 338 pacijenata sa mikrocitozom i hipohromskom anemijom. Kod 85 (25,1%) pacijenata posumnjali smo na talasemiju A₂, a kod sedam (2,07%) na Hb lepure heterozigotni. U saradnji sa Institutom za molekularnu genetiku i genetski inženjering, kod svih pacijenata dijagnoza je potvrđena na molekularnom nivou. Program za detekciju patološkog hemoglobina, zasnovan na testiranju sumnjive populacije u kombinaciji sa molekularnom dijagnozom i genetskim savetovanjem, predstavlja bezbedan način za prevenciju rađanja pacijenata sa ovim bolestima.

DIRECT MOLECULAR DIAGNOSIS OF CYP21A2 POINT MUTATIONS IN MACEDONIAN AND SERBIAN PATIENTS WITH 21-HYDROXYLASE DEFICIENCY

Violeta Anastasovska¹, Tatjana Milenković²,
Mirjana Kocova¹

¹Genetic Laboratory, Department of Endocrinology and Genetics, University Children's Clinic, Skopje, Republic of Macedonia

²Institute for Mother and Child Health, Belgrade, Serbia

Steroid 21-hydroxylase deficiency is present in 90–95% of all cases with congenital adrenal hyperplasia (CAH), an autosomal recessive disorder. It can present as a classic form with severe enzyme deficiency and prenatal onset of virilization. Females present ambiguous genitalia at birth and in both sexes virilization continues postnatally. The classic form is further divided into the salt-wasting form (SW) with a severe defect in aldosterone biosynthesis which leads to renal inability to conserve sodium, and a simple virilizing (SV) form with apparently normal aldosterone biosynthesis. The nonclassic form is characterized by mild enzyme deficiency and postnatal onset of premature adrenarche and pubarche in children, virilization in young women, and variable symptoms in young men. The severe classic form occurs in one in 10,000 to 15,000 Caucasians. The milder nonclassic CAH occurs in ~1 in 1,700 in the general population. Nine pseudogene derived point mutations account for about 80% of all defects in the CYP21A2 gene coding the 21-hydroxylase enzyme. Using the PCR/ACRS method, we have performed mutational screening of nine CYP21A2 mutations in 61 patients from R. Macedonia and 24 patients from R. Serbia, with different clinical presentations of CAH. Six different mutations were detected in 71.3% alleles in the Macedonian patients: IVS2 (35.2%), P30L (18%), Q318X (10.7%), V281L (4.1%), I172N (3.3%) and R356W (2.5%). Mutations were present in 85.4% of the SW, 83.4% SV and 47.7% LO alleles. In 59% (36/61) of the Macedonian patients the complete genotype was revealed with good correlation with the phenotype. The most common genotype was IVS2/IVS2 (37.3%). Five different mutations were detected in 64.6% alleles in the Serbian patients: P30L (31.3%), IVS2 (20.8%), Q318X (8.3%), R356W (4.2%) and I172N (4.2%). Mutations were present in 83.3% SW, 80% SV and 50% of the LO alleles. In 58.3% (14/24) of the Serbian patients the complete genotype was revealed, with good correlation with the phenotype. The P30L/P30L genotype was the most frequent (23.5%). Specific mutations are involved in different clinical forms of CAH and in

DIREKTNA MOLEKULARNA DIJAGNOZA TAČKASTIH MUTACIJA CYP21A2 KOD MAKEDONSKIH I SRPSKIH PACIJENATA SA NEDOSTATKOM 21-HIDROKSILAZE

Violeta Anastasovska¹, Tatjana Milenković²,
Mirjana Kocova¹

¹Genetska laboratorija, Odeljenje za endokrinologiju i genetiku, Univerzitetska dečija klinika, Skoplje, Republika Makedonija

²Institut za majku i dete, Beograd, Srbija

Nedostatak steroidne 21-hidroksilaze prisutan je u 90–95% svih slučajeva kongenitalne adrenalne hiperplazije (KAH), autozomalnog recesivnog poremećaja. Može se javiti u klasičnom obliku sa teškim nedostatkom enzima i prenatalnim početkom virilizacije. Kod žena su na rođenju prisutne nediferencirane genitalije a kod oba pola virilizacija se nastavlja posle rođenja. Klasični oblik se dalje deli na oblik sa gubitkom soli (eng. salt wasting, SW) i teškim defektom u biosintezi aldosterona, koji dovodi do nesposobnosti bubrega da sačuvaju natrijum, i prost virilizacijski (SV) oblik sa naizgled normalnom biosintezom aldosterona. Neklasični oblik odlikuju blag nedostatak enzima i postnatalni početak prevremene adrenarhe i pubarhe kod dece, virilizacija kod mladih žena i promenljivi simptomi kod mladih muškaraca. Težak klasični oblik javlja se kod jednog od 10.000 do 15.000 belaca. Blaži neklasični oblik KAH javlja se kod ~1 od 1.700 ljudi u opštoj populaciji. Devet tačkastih mutacija izvedenih iz pseudogena odgovorno je za oko 80% svih defekata u genu CYP21A2 koji kodira enzim 21-hidroksilazu. Pomoću metode PCR/ACRS obavili smo skrining devet mutacija CYP21A2 kod 61 pacijenta iz R. Makedonije i 24 pacijenta iz R. Srbije sa različitim kliničkim prezentacijama KAH. Šest različitih mutacija otkriveno je u 71,3% alela kod pacijenata iz Makedonije: IVS2 (35,2%), P30L (18%), Q318X (10,7%), V281L (4,1%), I172N (3,3%) i R356W (2,5%). Mutacije su bile prisutne u 85,4% SW, 83,4% SV i 47,7% LO alela. Kod 59% (36/61) makedonskih pacijenata otkriven je kompletan genotip, u dobroj korelaciji sa fenotipom. Najčešći je bio genotip IVS2/IVS2 (37,3%). Pet različitih mutacija je otkriveno u 64,6% alela kod srpskih pacijenata: P30L (31,3%), IVS2 (20,8%), Q318X (8,3%), R356W (4,2%) i I172N (4,2%). Mutacije su bile prisutne u 83,3% SW, 80% SV i 50% LO alela. Kod 58,3% (14/24) srpskih pacijenata otkriven je kompletan genotip, u dobroj korelaciji sa fenotipom. Najčešći genotip bio je P30L/P30L (23,5%). Specifične mutacije učestvuju u različitim kliničkim oblicima KAH i u različitim etničkim grupama, sa dobrom korelacijom između

different ethnic groups, with good genotype-phenotype correlation. High P30L frequency was found in both populations. Also, high prevalence of the mild P30L mutation, mostly associated with nonclassic CAH, was found in the Macedonian and Serbian classic SV patients. Our findings support the role of the P30L mutation in pronounced virilization. On the other side, lower V281L frequency was found in the Macedonian patients, and its complete absence in the Serbian NCAH patients, in comparison to the other European populations. The method is fast, simple and sensitive and has diagnostic value. It can also be used for prenatal diagnosis in pregnant women.

genotipa i fenotipa. Kod obe populacije otkrivena je velika učestalost P30L. Takođe, kod makedonskih i srpskih pacijenata sa klasičnim SV oblikom otkrivena je velika prevalenca blage mutacije P30L, uglavnom povezane s neklasičnom KAH. Naši rezultati potvrđuju ulogu mutacije P30L u izraženoj virilizaciji. S druge strane, otkrivena je manja učestalost V281L kod Makedonaca u odnosu na ostale evropske populacije kao i njeno potpuno odsustvo kod srpskih pacijenata sa NCAH. Metod je brz, jednostavan i osetljiv i ima dijagnostičku vrednost. Takođe, može se koristiti za prenatalnu dijagnozu kod trudnica.

SELECTIVE SCREENING FOR METABOLIC DISORDERS IN A SLOVENIAN PEDIATRIC POPULATION

Barbka Repič Lampret¹, Simona Murko¹,
Mojca Žerjav Tanjšek², Andraž Šmon²,
Tadej Battelino²

¹Unit for Special Laboratory Diagnostics,
University Children's Hospital,

University Medical Centre Ljubljana, Slovenia

²Department of Endocrinology, Diabetes and
Metabolic Diseases, University Children's Hospital,
University Medical Centre Ljubljana, Slovenia

Inborn errors of metabolism (IEM) are disorders in which there is a block at some point in the normal metabolic pathway caused by a genetic defect of a specific enzyme. Although each of these diseases is quite rare, as a group they affect about 1–2% of newborns and therefore account for a significant proportion of neonatal and childhood morbidity and mortality. It is important to detect a disease as soon as possible in order to prevent the complications or even death of the child. Diagnosis is important not only for treatment but also for genetic counseling. Modern technologies in this field allow early diagnosis of more than 100 inborn errors of metabolism. Nevertheless, to diagnose patients correctly, the use of appropriate technologies for selective screening in combination with teamwork is necessary. Symptomatic patients with suspected IEM are referred to University Children's Hospital, UMC Ljubljana, where they are diagnosed. Techniques used for selective screening in the Unit for Special Laboratory Diagnostics (USLD) are gas chromatography-mass spectrometry, ion exchange chromatography-post column derivatization, liquid chromatography-tandem mass spectrometry and isoelectric focusing. Fluorimetric method is used for enzyme activity

SELEKTIVNO TESTIRANJE NA POREMEĆAJE METABOLIZMA U SLOVENAČKOJ PEDIJATRIJSKOJ POPULACIJI

Barbka Repič Lampret¹, Simona Murko¹,
Mojca Žerjav Tanjšek², Andraž Šmon²,
Tadej Battelino²

¹Kabinet za specijalnu laboratorijsku dijagnostiku,
Univerzitetna dečija bolnica,

Univerzitetni medicinski centar Ljubljana, Slovenija

²Odeljenje za endokrinologiju, dijabetes i bolesti
metabolizma, Univerzitetna dečija bolnica,
Univerzitetni medicinski centar Ljubljana, Slovenija

Urođene greške metabolizma (UGM) jesu poremećaji u kojima postoji blokada na nekom mestu na normalnom metaboličkom putu izazvana genetskim defektom specifičnog enzima. Iako se ove bolesti pojedinačno prilično retko javljaju, kao grupa pogađaju oko 1–2% novorođenčadi i stoga imaju značajan udeo u neonatalnom i dečijem morbiditetu i mortalitetu. Važno je otkriti bolest što pre kako bi se sprečile komplikacije ili čak smrt deteta. Dijagnoza je važna ne samo za lečenje već i za genetsko savetovanje. Moderne tehnologije u ovoj oblasti omogućuju rano dijagnostikovanje preko 100 urođenih grešaka metabolizma. Ipak, da bi se postavila pravilna dijagnoza, neophodna je upotreba odgovarajućih tehnologija za selektivno testiranje u kombinaciji s timskim radom. Pacijenti sa simptomima koji izazivaju sumnju na UGM upućuju se u Univerzitetnu dečiju bolnicu UMC-a Ljubljana, gde im se postavlja dijagnoza. Tehnike koje se koriste za selektivno testiranje u Kabinetu za specijalnu laboratorijsku dijagnostiku su gasna hromatografija-masena spektrometrija, jon-sko-izmenjivačka postkolonska derivatizacija, tačna hromatografija-tandemska masena spektrometrija i izoelektrično fokusiranje. Za merenje aktivnosti enzima koristi se fluorimetrijska metoda. U 2013. godini,

measurement. In 2013, 802 samples were screened for organic acids per year, 1164 samples per year for amino acids, 349 samples per year for acylcarnitines, 59 samples per year for glycosylation disorders, 13 for Fabry disease and 2 for Gaucher disease. Confirmation tests are usually done in different specialized centers in European countries, and a few are done in the USLD, mostly genetic tests. In the Slovenian Register for Rare Diseases there are 170 patients with amino and organic acidemias, 5 patients with disorders in fatty acids metabolism, 1 patient with congenital disorder of glycosylation, 42 patients with Fabry disease (of which 35 are adult patients) and 7 patients with Gaucher disease. In Slovenia care for patients with IEM is centralized in the University Children's Hospital. It prides on its well organized team work and close cooperation between the laboratory and metabolic specialists. Regarding the known frequencies of IEM from the literature, we would expect more positive results than obtained. To evaluate these results, we are planning to do a pilot study on expanded newborn screening.

802 uzorka testirana su na organske kiseline na godišnjem nivou, 1164 uzorka godišnje na amino kiseline, 349 uzoraka godišnje na acilkarnitine, 59 uzoraka godišnje na poremećaje glikozilacije, 13 na Fabrijevu i dva na Goševu bolest. Testovi za potvrđivanje obično se izvode u raznim specijalizovanim centrima u evropskim zemljama, a nekoliko njih i u našem kabinetu, uglavnom genetskih testova. U slovenačkom Registru retkih bolesti nalazi se 170 pacijenata sa amino i organskim acidemijama, pet pacijenata sa poremećajem metabolizma masnih kiselina, jedan pacijent sa kongenitalnim poremećajem glikozilacije, 42 pacijenta sa Fabrijevom bolešću (od kojih su 35 odrasli ljudi) i sedam pacijenata sa Goševom bolešću. U Sloveniji je lečenje pacijenata sa UGM centralizovano u Univerzitetskoj dečjoj bolnici. Ona se ponosi svojim dobro organizovanim timskim radom i bliskom saradnjom između laboratorijskih stručnjaka i specijalista za metabolizam. S obzirom na učestalosti UGM poznate iz literature, očekivali smo više pozitivnih rezultata nego što dobijamo. Kako bi se ocenili ovi rezultati, planiramo izvođenje pilot studije o proširenom testiranju novorođenčadi.

30 YEARS OF EXPERIENCE WITH THE SCREENING PROGRAM FOR CONGENITAL HYPOTHYROIDISM IN CENTRAL SERBIA (1983–2014)

*Tatjana Milenković¹, Miloš Baničević¹,
Ljubica Zatezalo², Zagorka Subotić²,
Branka Opančina², Katarina Mitrović¹,
Slađana Todorović¹*

¹Department of Endocrinology

²Screening Laboratory, Mother and Child Health
Care Institute of Serbia

»Dr Vukan Čupić«, Belgrade, Serbia

Screening for congenital hypothyroidism (CH) for all newborns in Central Serbia was instituted in 1983 by determination of the TSH level in dried filter paper blood spots on the 3rd to 5th day of life. From 1983 to 2014, a total number of 412 newborns (41.4% males) with CH have been detected, resulting in the incidence of 1:3728. The etiologic diagnosis of CH was made by ^{99m}Tc scintigraphy and assessment of thyroid hormone levels. Using this approach, in 20.6% of children the diagnosis of athyrosis was established. In 43.7% of children the diagnosis of ectopy was made and 35.7% of children had thyroid gland »in situ«. The median age at onset of thyroxine (L-T4) replacement therapy was 18.7±6.8 days of life and the median initial L-T4 dose was 13.5±2.53 mg/kg/day. The intellectual outcome of

30 GODINA ISKUSTVA SA PROGRAMOM ZA TESTIRANJE NA KONGENITALNU HIPOTIREOZU U CENTRALNOJ SRBIJI (1983–2014)

*Tatjana Milenković¹, Miloš Baničević¹,
Ljubica Zatezalo², Zagorka Subotić²,
Branka Opančina², Katarina Mitrović¹,
Slađana Todorović¹*

¹Odeljenje endokrinologije

²Laboratorija za testiranje, Institut za zdravstvenu
zaštitu majke i deteta Srbije

»Dr Vukan Čupić«, Beograd, Srbija

Testiranje na kongenitalnu hipotireozu (KH) putem određivanja nivoa TSH u osušenim mrljama krvi na filter papiru između trećeg i petog dana života uvedeno je 1983. godine za svu novorođenčad u centralnoj Srbiji. Od 1983. do 2014. godine otkriveno je ukupno 412 novorođenčadi (41,4% muškog pola) sa KH, odakle proističe učestalost od 1:3728. Etiološka dijagnoza KH dobijena je pomoću ^{99m}Tc scintigrafije i određivanja nivoa hormona tiroide. Pomoću ovog pristupa kod 20,6% dece dijagnostikovana je atireoza. Kod 43,7% dece dijagnostikovana je ektopija, a 35,7% dece imalo je tiroidu *in situ*. Prosečna starost na početku primanja supstitucione terapije tiroksinom (L-T4) bila je 18,7±6,8 dana života, a srednja početna doza L-T4 bila je 13,5±2,53 mg/kg/dnevno. Intelktualni ishod proučavan je kod

363 children (3 months – 16 years) was studied and normal scores for the developmental (DQ) and intelligence (IQ) quotients were found in 94.9%. Outcome was not correlated to the age at onset of treatment, the initial dose and the severity of CH. The results of the screening program in Central Serbia document that early and efficient thyroxine replacement can normalize the intellectual outcome of patients with CH independently of the severity of the disease.

363 dece (3 meseca – 16 godina) i kod 94,9% nađeni su normalni rezultati za razvojni koeficijent i koeficijent inteligencije. Ishod nije bio u korelaciji sa starošću na početku lečenja, početnom dozom i težinom KH. Rezultati programa testiranja u centralnoj Srbiji dokazuju da rana i efikasna supstituciona terapija tiroksinom može normalizovati intelektualni ishod kod pacijenata sa KH nezavisno od težine bolesti.

CONCEPTS IN ESTABLISHING REFERENCE VALUES IN PEDIATRICS

Joseph Henny

UMS 011 INSERM, Versailles Saint Quentin University (UVSQ), Villejuif, France

Establishing reference values is one of the most difficult challenges in the field of laboratory medicine, and more specifically in pediatrics. In fact, the field of reference values is one of the most complex of the clinical laboratory sciences; it is at the interface between laboratory medicine, clinical medicine, statistical analysis, analytical sciences and epidemiology.

Defined reference values are assumed to be able to:

- select reference individuals: several methodologies are recommended for selecting »healthy« individuals. Ideally, it is recommended to recruit only no-disease individuals, but in practice this can be a difficult task. How can we define the state of »good health«? That is why some scientists proposed to recruit reference individuals from hospitalized populations (according to strict exclusion criteria) or by using data mining. However, the limitations of these last approaches are well known;
- identify outliers or non-healthy individuals;
- produce results of high analytical quality: it is recommended that analytical methods should be traceable to a reference system. But this is not always possible. Reference values are often determined by routine methods: the question of transfer of an analytical system (i.e. from one laboratory to another) is therefore asked;
- select appropriate statistical methods for deriving Reference Intervals and their confidence intervals, but also for assessing the

KONCEPTI U ODREĐIVANJU REFERENTNIH VREDNOSTI U PEDIJATRIJI

Joseph Henny

UMS 011 INSERM, Univerzitet Versaj Sen Kventin, Vilžuiif, Francuska

Određivanje referentnih vrednosti jedan je od najtežih zadataka u oblasti laboratorijske medicine, pre svega u pedijatriji. Štaviše, oblast referentnih vrednosti jedna je od najsloženijih u okviru kliničke laboratorijske nauke; ona predstavlja mesto na kom se susreću laboratorijska medicina, klinička medicina, statistička analiza, analitičke nauke i epidemiologija.

Za definisane referentne vrednosti se pretpostavlja da imaju sposobnost da:

- izaberu referentne pojedince: za biranje »zdravih« pojedinaca preporučeno je nekoliko metodologija. U idealnom slučaju, preporučuje se angažovanje isključivo osoba bez bolesti, što u praksi može biti teško izvodljivo. Kako ćemo definisati stanje »dobrog zdravlja«? Zbog ovoga su neki naučnici predložili da se referentni pojedinci angažuju iz redova hospitalizovane populacije (prema strogim kriterijumima za isključenje) ili na osnovu analize podataka. Međutim, ograničenja ovih postupaka su već dobro poznata;
- identifikuju netipične vrednosti ili nezdrave pojedince;
- proizvedu rezultate visokog analitičkog kvaliteta: preporučuje se da analitičke metode bude moguće pratiti do nekog referentnog sistema, što, međutim, nije uvek moguće. Referentne vrednosti često se određuju rutinskim metodama: zbog toga se postavlja pitanje transfera analitičkog sistema (npr. iz jedne laboratorije u drugu);

need for partitioning according to different criteria (age, sex, ethnicity, etc.). There is currently no »gold standard« for partitioning a reference sample;

- transfer the Reference Intervals to other laboratories. There are two basic requirements for transferring the results from one study to other laboratories: first, the two analytical systems should be comparable (see above). Secondly, the population of the second laboratory should be consistent with that of the original study.

Defining Reference Intervals in childhood adds an additional complexity by the fact that children's physiology is continuously changing. During childhood, the growth, dietary changes, hormonal changes induce marked alterations of most biomarkers. The first months of life and puberty are, from this point of view, critical. The interindividual variation should be considered carefully (the growth and hormonal changes are different from one child to another, particularly during puberty).

Recruitment is also challenging due to ethical and legal issues. In practice, it is wise to gather biological specimens from various sampling centers to dispose of a sufficient number of specimens for the needs of partitioning.

Recently, several outstanding studies proposed solutions for defining Reference in pediatrics. However, some issues remain.

- izaberu odgovarajuće statističke metode za izvođenje referentnih intervala i njihovih intervala poverenja (CI), ali i za procenjivanje potrebe za podelom na osnovu različitih kriterijuma (uzrast, pol, etnička pripadnost, itd.). Trenutno ne postoji »zlatni standard« za podelu nekog referentnog uzorka;
- prenesu referentne intervale u druge laboratorije. Postoje dva osnovna zahteva za prenošenje rezultata jedne studije u druge laboratorije: prvo, trebalo bi da ta dva analitička sistema budu uporediva (vidi iznad). Drugo, populacija u drugoj laboratoriji treba da odgovara onoj iz prvobitne studije.

Definisanje referentnih intervala u detinjstvu dodatno usložnjava problem, pošto se fiziologija kod dece stalno menja. Rast, promene u ishrani i hormonske promene u detinjstvu izazivaju upadljive alteracije kod većine biomarkera. Sa ovog aspekta, kritični su prvi meseci života i pubertet. Interindividualne varijacije treba pažljivo razmotriti (rast i hormonske promene se razlikuju od deteta do deteta, naročito u pubertetu).

Angažovanje je takođe problematično sa aspekta etike i zakona. U praksi, pokazalo se kao mudro skupiti biološke uzorke iz raznih centara za uzorkovanje kako bi se raspolagalo dovoljnim brojem uzoraka potrebnih za podele.

Nedavno je nekoliko izvanrednih studija predložilo rešenja za definisanje Reference u pedijatriji. Međutim, izvesni problemi još nisu rešeni.

CLOSING THE GAP IN PEDIATRIC REFERENCE INTERVALS: THE CALIPER INITIATIVE

Khosrow Adeli

Clinical Biochemistry, The Hospital for Sick Children, University of Toronto, Toronto, Canada

Clinical laboratory reference intervals provide valuable information to medical practitioners in their interpretation of quantitative laboratory test results, and therefore are critical in the assessment of patient health and in clinical decision-making. The reference interval serves as a health-associated benchmark with which to compare an individual test result. Unfortunately, critical gaps currently exist in accurate and up-to-date pediatric reference intervals for accurate interpretation of laboratory tests performed in children and adolescents. These critical gaps in the available laboratory reference intervals have the clear

KAKO REŠITI PROBLEM RAZLIKA U PEDIJATRIJSKIM REFERENTNIM INTERVALIMA: INICIJATIVA CALIPER

Khosrow Adeli

Klinička biohemija, Bolnica za bolesnu decu, Univerzitet u Torontu, Toronto, Kanada

Referentni intervali za kliničke laboratorije pružaju dragocene podatke medicinskom osoblju koje tumači rezultate kvantitativnih laboratorijskih testova, zbog čega su od suštinske važnosti za procenu zdravstvenog stanja pacijenta i donošenje kliničkih odluka. Referentni interval služi kao svojevrsan uzor u zdravstvu s kojim će se porediti pojedinačni rezultati testova. Nažalost, trenutno postoje velike razlike između preciznih, aktuelnih pedijatrijskih referentnih intervala za tačno tumačenje laboratorijskih testova obavljenih kod dece i adolescenata. Ova problematična neusaglašenost između dostupnih laboratorij-

potential of contributing to erroneous diagnosis or misdiagnosis of many diseases. To address these important gaps, several initiatives have begun internationally by a number of bodies including the KiGGS initiative in Germany, the Aussie Normals in Australia, the AACC-National Children Study in USA, the NORICHILD Initiative in Scandinavia, and the CALIPER study in Canada. In the current presentation, I will review the recent worldwide initiatives in pediatric reference intervals, and discuss the concept and feasibility of common reference intervals. I will also discuss the recently published CALIPER reference interval database. CALIPER (www.caliperdatabase.com) has recently developed age and gender specific pediatric reference intervals for a larger number of assays, based on a large and diverse healthy children cohort. The CALIPER database is based on a multiethnic population examining the influence of ethnicity on laboratory reference intervals. Thus, the database has proved to be of global benefit and is being adopted by hospital laboratories worldwide.

skih referentnih intervala očito lako može dovesti do toga da se mnoge bolesti netačno ili pogrešno dijagnosticuju. U cilju rešavanja ovog važnog problema započeto je nekoliko međunarodnih inicijativa od strane više tela, među kojima su inicijativa KiGGS u Nemačkoj, Aussie Normals u Australiji, AACC-National Children Study u SAD, Inicijativa NORICHILD u Skandinaviji i studija CALIPER u Kanadi. U ovoj prezentaciji daću pregled nedavno započetih inicijativa na svetskom nivou u vezi sa pedijatrijskim referentnim intervalima i razmotriti koncept i izvodljivost najčešćih referentnih intervala. Takođe ću govoriti o nedavno objavljenoj bazi podataka o referentnim intervalima CALIPER. CALIPER (www.caliperdatabase.com) nedavno je razvila pedijatrijske referentne intervale za veliki broj testova koji su specifični za uzrast i pol, a zasnivaju se na velikom i raznolikom skupu zdrave dece. Baza podataka CALIPER zasnovana je na multietničkoj populaciji, čime se ispituje i uticaj etničke pripadnosti na referentne intervale u laboratoriji. Ova baza podataka se zbog toga pokazala kao globalno korisna i usvajaju je bolničke laboratorije širom sveta.

POPULATION-BASED PEDIATRIC REFERENCE INTERVALS IN GENERAL CLINICAL CHEMISTRY: A SWEDISH SURVEY

Peter Ridfelt

Department of Medical Sciences, Clinical Chemistry, Uppsala University, Uppsala, Sweden

The clinical chemistry reference interval is one of the most important decision making tools used to distinguish between healthy and diseased individuals. Reference intervals should be established by measurements in blood samples from healthy subjects who are defined with respect to age and sex, and preferentially also ethnic group. In the NORIP project clinical chemistry analytes were measured in samples from 3600 healthy adults from the five Nordic countries. These reference intervals were implemented in most Nordic laboratories ten years ago. However, similar prospective population-based reference interval studies in healthy children are rare. One of the main reasons is the ethical issues around taking blood samples from healthy children. Also, pediatric reference intervals studies require many participants as they should reflect the different phases of physiological development from birth to adolescence. However, recently major advancements have been achieved with the publication of data from the CALIPER initiative in Canada, as well as projects from Sweden and Denmark. In the population-based

PEDIJATRIJSKI REFERENTNI INTERVALI U OPŠTOJ KLINIČKOJ HEMIJI ZASNOVANI NA ISPITIVANJU POPULACIJE: PROJEKAT U ŠVEDSKOJ

Peter Ridfelt

Odsek za medicinske nauke, Klinička hemija, Univerzitet u Upsali, Upsala, Švedska

Referentni interval u kliničkoj hemiji jedna je od najvažnijih alatki u odlučivanju i koristi se za razlikovanje između zdravih i obolelih pojedinaca. Referentne intervale treba ustanoviti merenjima u uzorcima krvi zdravih subjekata definisanih prema starosti i polu, i kada je moguće etničkoj pripadnosti. U projektu NORIP analiti iz kliničke hemije su izmereni u uzorcima uzetim od 3600 zdravih odraslih osoba iz pet nordijskih zemalja. Ovi referentni intervali uvedeni su u većini nordijskih laboratorija pre deset godina. Međutim, slične prospektivne studije o referentnim intervalima zasnovanim na populaciji su retke kod zdrave dece. Jedan od glavnih razloga su etička pitanja vezana za uzimanje uzoraka krvi od zdrave dece. Takođe, studije o pedijatrijskim referentnim intervalima zahtevaju mnogo učesnika, pošto treba da odražavaju različite faze fiziološkog razvoja od rođenja do adolescencije. Ipak, nedavno je ostvaren veliki napredak objavljivanjem podataka iz inicijative CALIPER u Kanadi, kao i projekata iz Švedske i Danske. U švedskoj studiji zasnovanoj na populaciji uzorci venske krvi dobijeni su od 701 zdravog deteta

Swedish study venous blood samples were obtained from 701 healthy children aged 6 months to 19 years. The children were primarily of Swedish origin; ethnic background was not recorded. The children were recruited in childcare centers, kindergartens and schools in the Falun area in central Sweden. Patients with chronic disease or infection in the last 10 days were asked not to participate. A questionnaire which included questions about health, diseases, allergies and medications was completed. The children were not fasting. Blood sampling included serum and EDTA tubes. Age- and gender specific pediatric reference intervals were defined for approximately 50 general clinical chemistry, hematology and certain endocrine components. Instruments used were Abbott Architect (general chemistry), Siemens Bayer Advia (hematology) and Mono S and Tosoh systems (HbA1c). To facilitate the use on other platforms, NORIPs serum X was used for traceability to recognized reference materials. The statistical treatment was similar to the principles used in the NORIP project. This includes calculation of nonparametric 2.5th and 97.5th percentiles, Dixon's test for detecting outliers, and partitioning due to age and gender differences according to the Lahti model used in NORIP. Partitioning with respect to age was performed as »educated guesses« on the basis of previously published data, and a graphic visualization of the data for individual analytes. Details of the results in the Swedish study for general clinical chemistry, hematology and certain hormones are available. The Swedish study only contains data on children from 6 months of age. This creates a practical problem when implementing the data in the clinical routine. Most analytes show large changes in healthy children during the first weeks or months after birth. One practical solution may be to add comments to the laboratory reports with a warning that reference intervals are lacking for the youngest age group. The drawback is that in today's laboratory information systems and electronic health records such a procedure will not generate any alerts for pathological results. Alternatively, pragmatic extrapolations for the youngest children based on literature references, such as the Canadian CALIPER project, could be used where gaps still exist.

uzrasta od 6 meseci do 19 godina. Deca su bila uglavnom švedskog porekla; etnička pripadnost nije beležena. Deca su angažovana u ustanovama za brigu o deci, obdaništima i školama u oblasti Falun u centralnoj Švedskoj. Pacijenti sa hroničnim bolestima ili infekcijama u prethodnih 10 dana zamoljeni su da ne učestvuju. Popunjavan je upitnik sa pitanjima o zdravstvenom stanju, bolestima, alergijama i lekovima. Deca nisu postila. Za uzimanje krvi korišćene su epruvete za serum i EDTA. Pedijatrijski referentni intervali specifični za uzrast i pol definisani su za oko 50 komponenti opšte kliničke hemije, hematologije i za izvesne endokrine komponente. Korišćeni su instrumenti Abbott Architect (opšta hemija), Siemens Bayer Advia (hematologija) i Mono S i Tosoh (HbA1c). Kako bi se olakšala upotreba na ostalim platformama, serum X iz NORIP-a je upotrebljen da se omogući praćenje do poznatih referentnih materijala. Statistička obrada bila je slična principima iz projekta NORIP, što znači: računanje neparametrijskih procenta 2,5 i 97,5, Diksonov test za otkrivanje netipičnih vrednosti i podele usled razlika u starosti i polu prema Lahtijevom modelu korišćenom u NORIP-u. Podele prema starosti su urađene na osnovu nagađanja (educated guess) u skladu s prethodno objavljenim podacima, kao i grafičkog predstavljanja podataka za pojedinačne analite. Detalji o rezultatima švedske studije za opštu kliničku hemiju, hematologiju i izvesne hormone su dostupni. Švedska studija sadrži samo podatke o deci starijoj od šest meseci, što stvara praktičan problem prilikom uvođenja podataka u svakodnevnu kliničku praksu. Većina analita pokazuje velike promene kod zdrave dece tokom prvih nedelja ili meseci po rođenju. Praktično rešenje može biti da se laboratorijskim izveštajima dodaju komentari sa upozorenjem da za najmlađi uzrast ne postoje referentni intervali. Mana je što u današnjim laboratorijskim informacionim sistemima i elektronskim bazama podataka takva procedura neće uključiti alarm za patološke rezultate. Umesto toga, za najmlađu decu bi se mogle koristiti pragmatične ekstrapolacije zasnovane na referencama iz literature, kao što je kanadski projekat CALIPER, tamo gde još ne postoje podaci.