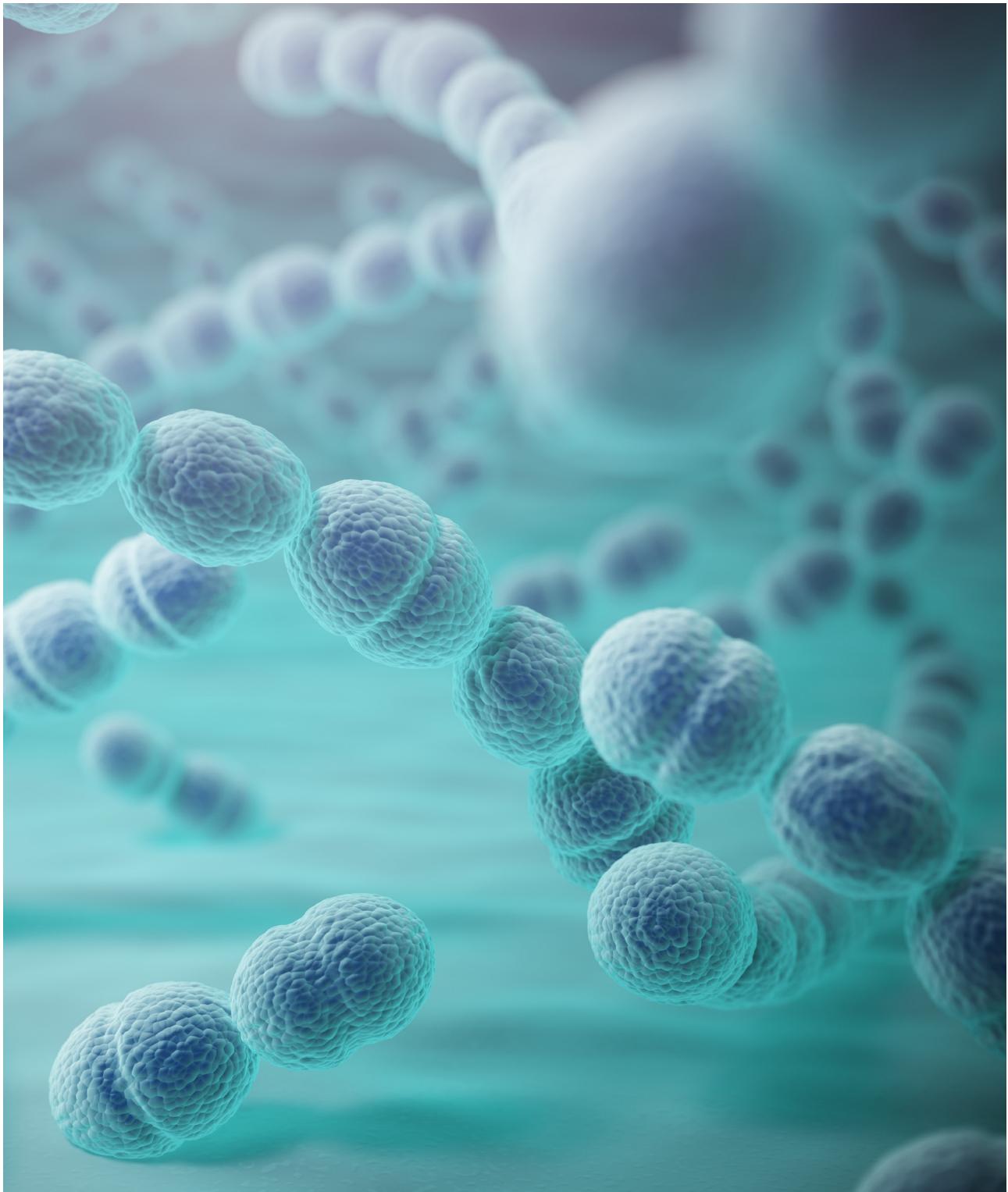




# LABORATORIJSKA MEDICINA

ZNANSTVENO-STROKOVNO GLASILO SLOVENSKEGA ZDRUŽENJA  
ZA KLINIČNO KEMIJO IN LABORATORIJSKO MEDICINO

01  
MAR 2019



SZKLM



# Uvodnik

Pa je izšla! Pred vami je prva številka revije LABORATORIJSKA MEDICINA (LM). Kot govorí že samo ime, gre za znanstveno strokovno revijo Slovenskega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM), namenjeno objavi znanstvenih in strokovnih člankov s področja laboratorijske medicine.

Pričajoča številka obravnava šest različnih področij laboratorijske medicine, ki so bila obravnavana tudi na strokovnih srečanjih SZKKLM v letu 2018 in sicer: laboratorijska diagnostika vrojenih bolezni presnove, predanalitika, porfirije, diagnostika "od spočetja do rojstva", POCT včeraj, danes jutri ter učinkovitost in kompetentnost v laboratorijski medicini. V okviru posameznega področja avtorji predstavljajo njegov pregled, aktualne zadeve, problematiko kot tudi morebitne vizije s predstavljene tematike.

Ob izidu prve številke Laboratorijske medicine si želim, da bi revija našla svoje mesto med znanstvenimi in strokovnimi revijami, da bi jo avtorji s področja laboratorijske medicine prepoznali kot možnost za objave aktualnih strokovnih ali znanstvenih izsledkov, strokovna javnost pa kot dober vir informacij.

Na koncu vam zaželim še zanimivo in prijetno prebiranje prve številke.

Srečno LABORATORIJSKA MEDICINA!

Blaž Krhin

Glavni in odgovorni urednik

**Glavni in odgovorni urednik:**  
Blaž Krhin

**Uredniški odbor:**  
Pika Meško Brguljan, Evgenija Homšak,  
Saša Bratož, Elizabeta Božnar Alič

**Lektoriranje:**  
Janja Korošec

**Oblikovanje in tisk:**  
Publik Market

**Naklada:**  
500 izvodov

ISSN 2670-4463

Izhaja enkrat letno

**Izdajatelj:**  
Slovensko združenje za  
klinično kemijo in laboratorijsko medicino

**Naslov uredništva:**  
Dunajska cesta 22  
1000 Ljubljana, Slovenija

**T:** +386 599 76089

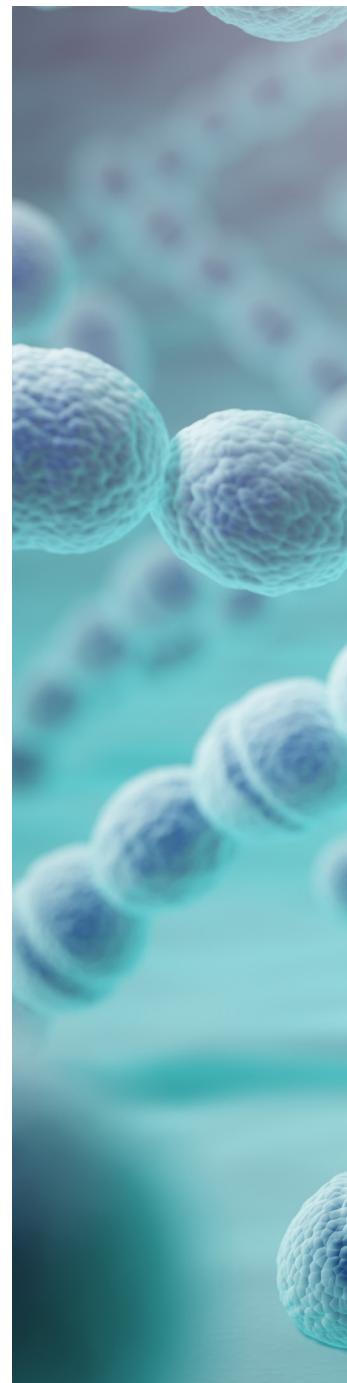
**F:** +386 1 2321331

**E:** info@szkklm.si

**W:** www.szkklm.si

# Kazalo

<b>Laboratorijska diagnostika vrojenih bolezni presnove</b>	<b>7</b>
<b>Mojca Žerjav Tanšek</b>	
Prepoznavanje vrojenih bolezni presnove in klinični pomen laboratorijske diagnostike	8
<b>Andraž Šmon</b>	
Presejanje novorojenčev za vrojene bolezni presnove	11
<b>Barbka Repič Lampret</b>	
Personalizirana stopenjska laboratorijska diagnostika vrojenih bolezni presnove	14
<b>Katarina Trebušak Podkrajšek</b>	
Genetska diagnostika vrojenih bolezni presnove	17
<b>Žiga Iztok Remec</b>	
Stopenjska laboratorijska diagnostika fenilketonurije	20
<b>Predanalitika</b>	<b>25</b>
<b>Lidija Gobec</b>	
Poenotenje vodenja kazalnikov kakovosti predanalitske faze po priporočilih IFCC 2016/21; zavrnitvena merila za vzorce	26
<b>Lidija Gobec</b>	
Elektronsko vodenje kazalnikov kakovosti predanalitske faze v LIS	27
<b>Alenka France-Štiglic</b>	
Zunanja ocena kakovosti za predanalitsko fazo	28
<b>Nada Snoj</b>	
Nova priporočila za odvzem venske krvi	29
<b>Bernarda Jevšnikar</b>	
Presoja predanalitskih dejavnikov v UKC Maribor	34
<b>Greta Štrakl</b>	
Klinični primeri predanalitskih napak	35
<b>Porfirije</b>	<b>39</b>
<b>Sverre Sandberg</b>	
Diagnosing Porphyria	40
<b>Mira Mykletun, Aasne Karine Aarsand, Egil Støle, Jørild Haugen Villanger, Mette Christophersen Tollånes, Carl Baravelli, Sverre Sandberg</b>	
Porphyrias in Norway	41
<b>Eva Fliser</b>	
Osnovne preiskave za porfirije – kaj opravljamo v Sloveniji?	50
<b>Michael Vogeser</b>	
German experiences with porphyria	53
<b>Diagnostika "od spočetja do rojstva"</b>	<b>55</b>
<b>Milan Reljič</b>	
Sodobni pristopi pri obravnavi neplodnosti	56





<b>Borut Kovačič</b>	
Laboratorijske metode OBMP .....	59
<b>Evgenija Homšak</b>	
Laboratorijska diagnostika pred in med nosečnostjo .....	62
<b>Nadja Kokalj Vokač</b>	
Prenatalna genetska diagnostika v laboratoriju za medicinsko genetiko UKC Maribor .....	65
<b>Faris Mujezinović</b>	
Spremljanje zdrave in patološke nosečnosti .....	66
<hr/>	
<b>POCT včeraj, danes, jutri</b>	<b>71</b>
<b>Danijela Furlan, Petra Malavašič</b>	
Dejavnost POCT včeraj, danes, jutri .....	72
<b>Tadeja Dežman</b>	
POCT v splošni bolnišnici Novo mesto .....	75
<b>Marjanca Doltar</b>	
POCT danes v primarnem zdravstvu Dolenjske in Bele krajine .....	78
<b>Saša Bratož</b>	
POCT včeraj, danes, jutri – zakoni, standardi, priporočila .....	80
<b>Pika Meško Brguljan</b>	
Informacijski sistem in obvladovanje POCT področja .....	82
<b>Petra Malavašič</b>	
POCT jutri .....	85
<b>Sabina Jakše Hren</b>	
Sodobna antikoagulantna terapija – POCT včeraj, danes, jutri .....	88
<hr/>	
<b>Učinkovitost in kompetentnost v laboratorijski medicini</b>	<b>93</b>
<b>Maja Klun</b>	
Javno naročanje v zdravstvu .....	94
<b>Aleš Jerin</b>	
Izboljšave na področju kakovosti in racionalizacija dela v medicinskih laboratorijih .....	96
<b>Nejc Lamovšek</b>	
Analiza učinkovitosti javnih biomedicinskih laboratorijev .....	99
<b>Nejc Lamovšek</b>	
Ocena učinkovitosti javnih biomedicinskih laboratorijev – študija primera .....	101



**01**

Laboratorijska  
diagnostika  
vrojenih bolezni  
presnove

# Prepoznavanje vrojenih bolezni presnove in klinični pomen laboratorijske diagnostike

**Mojca Žerjav Tanšek**

UKC Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove, Ljubljana, Slovenija

## UVOD

Vrojene presnovne bolezni (VPB) so posledica bolezenskih različic na genih za sintezo encimov, njihovih koencimov ali drugih v presnovo vključenih beljakovin. Bolezenske posledice genskih napak so odvisne od mesta in vloge delujoče beljakovine, kažejo pa se pogosto kot nepravilno kopiranje nepresnovljenega substrata, ki se lahko bolezensko presnavlja po alternativih poteh ali kot pomanjkanje produkta encimske reakcije. Z metodami sekvenciranja druge generacije celotnega eksoma in genoma bolnikov se število prepoznanih novih VPB v zadnjih letih hitro povečuje. Še pred 100 leti je medicina poznala le štiri VPB (cistinurijo, alkaptonurijo, pentozurijo in albinizem), v 80. letih prejšnjega stoletja okrog 200, danes pa ta številka že presega število 800. VPB so monogenske bolezni, ki se v veliki večini dedujejo autosomno recessivno. Stopnja preostale encimske aktivnosti pomembno vpliva na težo in čas pojava bolezenskih znakov: nižja ali odsotna aktivnost narekuje zgodnji pojav bolezni, težji potek in pogosto tudi kratko življensko dobo, z delno ohranjeno aktivnostjo pa lahko ista bolezen poteka z blagimi in neznačilnimi znaki kasneje v odraslosti. Glede na okvare presnovnih poti so VPB združene v sedem velikih skupin: 1. skupina bolezni z motnjo organskih in aminokislin, 2. motnje presnove ogljikovih hi-

dratov, maščobnih kislin in ketonov, 3. lizosomske bolezni kopičenja, 4. peroksisomske bolezni, 5. bolezni z motnjo presnove piruvata in mitohondrijske oksidacije, 6. motenje glikozilacije (*CDG – Congenital Disorders of Glycosylation*) in 7. motnje nevromodulatorjev in majhnih molekul.

Zgodnejša prepoznavava, predvsem s presejalnimi testi, je pogosto ključna za uspešno zdravljenje nekaterih VPB in lahko izboljša možnosti za ozdravitev obolelih otrok. Čeprav se posamezne VPB ne pojavljajo pogosto in vse sodijo med redke bolezni, pa gledano v celoti, niso redke. Študije kažejo, da je pojavnost vseh VPB skupaj ocenjena na 1 na 800 do 1400 oseb. Če prenesemo to oceno v Slovenijo, potem se vsako leto v Sloveniji rodi vsaj 20 otrok z VPB. Glede na genetsko naravo bolezni pri večini obstaja možnost prenatalne diagnostike, kar je ključno tudi za genetsko svetovanje družini.

## USMERJENE BIOKEMIČNE PREISKAVE OB DOMNEVNI VPB

Bolezenska slika različnih VPB je izjemno raznolika in pogosto brez značilnih vodilnih bolezenskih znakov in simptomov, ki bi omogočali diagnozo že ob natančnem pregledu bolnika. Obenem ima ista bolezen lahko zelo različne pojavne oblike. Ker nam v prepoznavi VPB ne more veliko pomagati klinična slika, so temelj diagnostike biokemične preiskave telesnih tekočin, predvsem krvi in urina, redkeje likvorja ali samega tkiva organov. Temeljno izhodišče so pregledi koncentracije ključnih presnovkov v krvi, kot so glukoza, laktat, amonijev ion, ketoni, aminokislinska sestava plazme, prisotnost acilkarnitinov v krvi, stanje pH krvi s plinsko analizo in še mnoge druge meritve. Podobno v urinu preverjamo izločene presnovke organskih kislin, aminokislin in nekatere presnovke čezmerne kopičenja v telesu (npr. glikozaminoglikane, oligosaharide pri lizosomskih boleznih kopičenja). Na podlagi kombinacije klinične slike in različnih vrednosti presnovkov v krvi sklepamo o vrsti bolezenske motnje, v naslednji stopnji pa testi encimskih aktivnosti potrdijo ali ovržejo domnevo, da gre za bolezen. Dokončna diagnoza večine VPB je z genetsko potrditvijo. Če encim ni dosegljiv v telesnih tekočinah, poskušamo diagnozo potrditi s sekvenciranjem nabora vzročnih genov.

Številne VPB, zlasti organske acidemije, motnje v ciklus sečnine in nekatere bolezni presnove aminokislin, se značilno izrazijo že v neonatalnem obdobju z znaki akutne življenske ogroženosti. Simptomi so odraz toksičnih učinkov nakopičenih presnovkov na osrednje živčevje. Prizadeti otroci so ob rojstvu brez znakov bolezni, saj se presnovki pri plodu v maternici odstranjujejo skozi posteljico in jih ustrezeno presnovi zdrava nosečnica. Klinična slika se po rojstvu lahko pri novorojencu izrazi z različnim časovnim zamikom po prvih beljakovinskih obrokih mleka in zaradi katabolnega stanja po rojstvu. Najprej se pojavijo težave pri hranjenju in slabša odzivnost, lahko tudi drugi znaki motečega delovanja osrednjega živčevja – motnje mišičnega tonusa, motnje dihanja z dihalnimi premori in krči, kar lahko napreduje vse do kome. Pogosto se pojavijo znaki možganskega edema, lahko pa tudi možganska krvavitev.

Hipoglikemija je vodilni znak tudi pri prirojenih napakah v oksidaciji maščobnih kislin. Te so pomembne zaradi sorazmerne pogostnosti in različnosti klinične slike. Prizadeti bolniki v obdobjih stradanja ne morejo uporabiti uskladiščene maščobe za izvor energije in zato hitro izčrpajo zaloge glikogena. Kljub hipoglikemiji je moteno nastajanje ketonskih teles. Tako je hipoglikemija značilno neketotična. Hipoglikemija je pri teh VPB lahko vodilni znak ali pa so pridružene biokemične spremembe okvare jeter. Ključne za

diagnozo oksiadacije maščobnih kislin so vrednosti analize acilkarnitinov v krvi s tandemsko masno spektrometrijo.

Najbolj znana VPB motnje presnove ogljikovih hidratov, ki se izrazi z zlatenico, je galaktozemija. Zaradi pomanjkanja encima galaktoza-1-fosfat uridil transferaze pride do kopiranja galaktoza -1- fosfata in drugih presnovkov, ki imajo neposreden toksični učinek na jetra. Če bolniki niso ustrezeno zdravljeni, imajo kasneje motnjava očesne leče in so umsko ter gibalno manj razviti. Ob klinični domnevi, da gre za galaktozemijo, je prisotnost reducirajočih snovi v urinu brez glukozurije prvi orientacijski laboratorijski test, dokončna potrditev diagnoze pa temelji na dokazu znižane encimske aktivnosti v eritrocitih.

Pri lizosomskim motnjah kopičenja (sfingolipidoze, kopičenje lipidov) z znaki motenega delovanja jeter in/ali tudi s kopičenjem v živčevju (GM-1 gangliozoza tip I, Gaucherjeva bolezen, Nieman-Pickova in Wolmanova bolezen, ki imajo vse pridruženo tudi povečano vranico) so simptomi bolezni predvsem kognitivni upad in dodatne spremembe na drugih organskih sistemih (na kosteh, očeh, srcu). Podobno je tudi pri lizosomskem kopičenju pri mukopolisaharidozah (motnje presnove glikozaminoglikanov, ki jih lahko presejalno določamo v urinu), kjer pa se simptomi in znaki le redko izrazijo v prvih mesecih življenja. Večinoma diagnoze potrdimo z določanjem encimske aktivnosti v plazmi ali levkocitih.

Napake v presnovi piruvata ali v respiratorni verigi lahko vodijo v primarno laktatno acidozo, za katero je diagnostična preiskava analiza encimskih aktivnosti mitohondrijске presnove v tkivnih vzorcih, ki jih je treba globoko zamrzniti takoj po odvzemu. Najbolj informativni so bioptični vzorci mišice bolnika, redkeje uporabimo biopsijo kože in drugih organov ali kulture fibroblastov, preiskave pa potekajo le v specializiranih laboratorijih.

Znižane ali odsotne encimske aktivnosti v peroksisomih in pri CDG so redki primeri VPB, pri katerih na diagnozo lahko pomislimo že, ko se otrok roditi, saj ima nekatere značilne razvojne nepravilnosti. Sem sodita peroksisomska bolezen Zellwegerjev sindrom in neonatalna adrenolevkodistrofija. Pri teh skupinah bolezni so potrebne usmerjene preiskave. Ob domnevi, da gre za peroksisomske motnje, določamo fitansko, pristansko in pipecolno kislino ter zelo dolge maščobne kisline v plazmi in plazmalogene v eritrocitih, za CDG je presejalni test fenotipizacija transferina in apolipoproteina CIII.

## ZAKLJUČEK

Zgodnja klinična prepoznavava otrok s VPB, takojšnje ukrepanje in napotitev v center z ustreznimi laboratorijskimi zmožljivostmi, so temeljnega pomena za postavitev diagnoze in uspešno zdravljenje. Presejalne preiskave se opravljajo v vseh laboratorijsih, usmerjenih v diagnostiko VPB, medtem ko so

mnoge encimske preiskave dosegljive le v velikih specializiranih evropskih laboratorijsih, kamor pošiljamo tudi vzorce iz Slovenije. Dokončno diagnozo večine VPB postavimo z genetsko potrditvijo bolezni.

## LITERATURA

1. Zschocke J, Hoffmann GF. Vademecum Metabolicum, 3. izdaja, 2011, ISBN 978-3-7945-2816-5. Elektronska verzija dosegljiva na: <http://evm.health2media.com/#/start>
2. Applegarth DA, Toone JR, Lowry RB. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics*. 2000;105(1):e10.
3. Lightowers RN, Taylor RW, Turnbull DM. Mutations causing mitochondrial diseases. What is new and what challenges remain? *Science* 2015; 349:1494-9.
4. Welling L, Bernstein LE, Berry GT et al. International clinical guideline for the management of classical galactosemia: diagnosis, treatment, and follow-up. *J Inherit Metab Dis* 2017;40:171-176.
5. Peanne R, de Lonlay P, Foulquier F et al. Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis? *Eur J Med Genet* 2017; Dosegljivo na: <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.012>
6. Saudubray JM, Ogier de Baulny H, Carpentier C. Clinical approach to inherited metabolic diseases. V: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, eds. *Inborn metabolic diseases*. 4th revisited ed, Berlin:Springer Verlag, 2006
7. Žerjav Tanšek M. Prirojene presnovne bolezni. V: Kržšnik C s sodelavci, eds. *Pediatrija*, Ljubljana, DZS, 2014:181-180-202.
8. Blau N, Duran M, Gibson KM, Dionisi-Vici C, eds. *Physician's guide to the laboratory diagnosis, treatment and follow-up of metabolic diseases*. Springer, Berlin, 2014.

# Presejanje novorojencev za vrojene bolezni presnove

**Andraž Šmon**

UKC Ljubljana, Pediatrična klinika, Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko, Ljubljana, Slovenija

## UVOD

Vrojene bolezni presnove (VBP) so genetsko pogojene motnje s pojavnostjo, nižjo od 1 : 10.000 živorojenih otrok (1). Pravilna in pravočasna diagnoza VBP lahko prepreči hude posledice bolezni ali smrt, zato so presejalne metode zelo pomembne v preventivni medicini. Njihov cilj je odkritje bolezni preden se pojavijo prvi simptomi oz. v prvih stadijih. Uporablajo se na večji populaciji ljudi brez znakov bolezni, med katerimi iščemo posameznike, ki imajo določeno tveganje za specifično bolezen. Presejanje novorojencev (NBS) za odkrivanje VBP se je začelo leta 1963 v ZDA s pomočjo bakterij-

skega inhibicijskega testa za fenilketonurijo (Guthriejev test), motnjo v presnovi aminokislom (2). NBS se je kmalu razširilo z vključitvijo novih bolezni in sedaj poteka v številnih državah po svetu (3). Pomembno vlogo pri presejanju novorojencev ima tandemkska masna spektrometrija (MS/MS), saj je s to metodo mogoče kvantificirati številne aminokisline in acilkarnitine iz posušenih vzorcev krvi, kar omogoča odpiranje številnih motenj v presnovi aminokislom, organskih kislin in motenj v presnovi maščobnih kislin (4).

## IZBOR VROJENIH BOLEZNI PRESNOVE ZA VKLJUČITEV V PROGRAME PRESEJANJA NOVOROJENCEV

Presejanje na vse VBP, ki jih je mogoče odkriti z MS/MS, ni smiselno. Veliko od njih namreč ne zadošča osnovnim pogojem za vključitev v programe presejanja, saj ne povzročajo klinične slike, zanje ni razvitega učinkovitega zdravljenja in niso stroškovno učinkoviti (4). Tako države oziroma centri za presejanje novorojencev v nabor za presejanje vključijo bolezni, za katere presodijo, da imajo dovolj visoko pojavnost, za njihovo odkrivanje obstaja dovolj specifičen in občutljiv test ter je dokazano izboljšanje zdravja zaradi zgodnjega odkritja bolezni (5, 6).

Ameriška in evropska priporočila za izbor presejanih bolezni se med seboj razlikujejo (5, 6). V ZDA ima vsaka zvezna država svoj nabor presejanih bolezni (7). Tudi med evropskimi državami so velike razlike v naboru presejanih bolezni (8). V večini evropskih držav (tudi v Sloveniji (9)), poteka presejanje vsaj za kongenitalno hipotirozo in fenilketonurijo (10). Za njuno odkrivanje namreč ni potrebna draga oprema, kot je tandemski masni spektrometer (8). Tudi med evropskimi državami, v katerih poteka presejanje VBP z MS/MS, je število presejanih

bolezni različno (8). V Veliki Britaniji tako z MS/MS določajo poleg fenilketonurije le pet drugih VBP (11). Nemčija in Danska presejata na 15 VBP, Avstrija pa na 29 VBP (3, 8). V ZDA je v programu NBS 20 primarnih VBP, ki naj bi bile vključene v vseh zveznih državah, in 22 sekundarnih VBP, za vključitev katerih poteka odločitev na ravni vsake zvezne države (4, 12).

Glede na to, da je skupna pojavnost VBP, ki jih imajo države vključene v programe presejanja novorojencev, med 1 : 800 in 1 : 2500 (13), bi v Sloveniji letno pričakovali okrog 10 novih bolnikov z VBP, ki pa so doslej večinoma ostajali neprepoznani. Po uvedbi razširjenega presejanja novorojencev so v nekaterih državah poročali o višjih izračunanih incidencah oz. o porastu diagnosticiranih bolnikov z VBP (14). Pred presejanjem presnovnih bolezni lahko le-te niso bile diagnosticirane ali pa so bolniki v presnovnih iztirjenjih umrli z drugo diagnozo. Zgodnja prepoznavna VBP je ključna za preprečevanje življenje ogrožajočih presnovnih poslabšanj (15–17). Obenem je prava diagnoza pomembna tudi za genetsko svetovanje družini in za kaskadno presejanje sorojencev in drugih svojcev.

## PREISKAVA PRESEJANJA NOVOROJENCEV V SLOVENIJI

Glede na VBP, za katere presejajo v EU ter ZDA in na podlagi naših rezultatov analiz v DBS, smo za našo preiskavo izbrali nabor VBP, primeren za Slovenijo (tabela 1). S pomočjo tandemске masne spektrometrije smo kvantificirali 28 acilkarnitinov in 12 aminokislin v posušenih vzorcih krvi na filtrirnem papirju 10048 novorojenčkov. Med njimi smo izbrali 113 novorojencev, ki so imeli najvišje tveganje za izbrane vrojene bolezni presnove, in jih povabili na potrditvene analize. Na vabila se je odzvalo 85 preiskovancev. Pri njih smo opravili presnovne potrditvene analize (ponovno analizo acilkarnitinov in aminokislin iz posušenih vzorcev krvi, analizo organskih kislin v urinu ter analizo aminokislin v plazmi) in analizo izbranih genov, povezanih z vrojenimi boleznimi presnove, ki smo jih ana-

lizirali s pomočjo sekvenciranja naslednje generacije. Dokončno smo VBP potrdili pri štirih bolnikih, med njimi smo našli en primer glutarične acidemije tipa 1, en primer pomanjkanja zelo-dolgoverižne-acil-CoA-dehidrogenaze ter dva primera pomanjkanja 3-metilkrotonil-CoA-karboksilaze. Pri vseh bolnikih smo našli vzročne genetske spremembe, ki v slovenski populaciji še niso bile opisane. S pomočjo rezultatov smo postavili tudi ustrezne izključitvene vrednosti za slovensko populacijo ter z rezultati naše preiskave in številom klinično potrjenih primerov vrojenih bolezni presnove v Sloveniji med preiskovanci, ki so bili rojeni med 1999 in 2013, ocenili pojavnosti VBP v Sloveniji (tabela 1), ki so primerljive z evropskimi (18).

Bolezen	Ocenjena pojavnost v Sloveniji
Vse vključene vrojene bolezni presnove	1 : 2.762
Pomanjkanje 3-metilkrotonil-CoA-karboksilaze	1 : 5.024
Fenilketonurija	1 : 6.769
Pomanjkanje zelo-dolgoverižne-acil-CoA-dehidrogenaze	1 : 10.048
Pomanjkanje srednjeverižne-acil-CoA-dehidrogenaze	1 : 54.007
Glutarična acidemija tipa 1	1 : 146.949
Glutarična acidemija tipa 2	1 : 293.897
Pomanjkanje 3-hidroksiacil-CoA-dehidrogenaze	1 : 293.897
Metilmalonska acidemija	1 : 293.897
Propionska acidemija	1 : 293.897
Pomanjkanje karnitin-palmitoiltransferaze 1	< 1 : 293.897
Pomanjkanje karnitin-palmitoiltransferaze 2	< 1 : 293.897

Bolezen	Ocenjena pojavnost v Sloveniji
Motnja privzema karnitina	< 1 : 293.897
Izovalerična acidemija	< 1 : 293.897
Bolezen javorjevega sirupa	< 1 : 293.897

V naši raziskavi smo odkrili bolnike pred pojavom kliničnih znakov, kar lahko pomembno pripomore k preprečitvi znakov in najboljšemu ukrepanju proti razvoju bolezni. Želimo, da bi naši rezultati vplivali na vpeljavo novih metod

za NBS v Sloveniji in na širitev programa NBS novorojenčev z dodatnimi VBP, kot so huda kombinirana imunska pomanjkljivost, kongenitalna adrenalna hiperplazija in cistična fibroza.

## LITERATURA

- Kasper DC, Ratschmann R, Metz TF, Mechtler TP, Möslinger D, Konstantopoulou V, et al. The national Austrian newborn screening program - eight years experience with mass spectrometry. Past, present, and future goals. *Wien Klin Wochenschr.* 2010;122(21–22):607–13.
- MacCready RA, Hussey MG. Newborn phenylketonuria detection program in Massachusetts. *Am J Public Heal Nations Heal.* 1964;54(12):2075–81.
- Burgard P, Cornel M, Filippo F Di, Haeg G, Hoffmann GF, Lindner M, et al. Report on the practices of newborn screening for rare disorders implemented in Member States of the European Union, Candidate, Potential Candidate. 2012;(2009).
- Watson MS, Mann MY, Lloyd-Puryear MA, Rinaldo P, Howell RR, Group AC of MGNSE. Newborn screening panel and system. *Genet Med.* 2006;8(Suppl 1):12S–252S.
- Cornel M, Rigter T, Weinreich S, Burgard P, Hoffmann GF, Lindner M, et al. Newborn screening in Europe Expert Opinion document. 2011;399755(2009):1–49.
- Wilson J, Jungner Y. Principles and practice of screening for disease. *World Heal Organ.* 1968;65(4):281–393.
- Therrell BL, Padilla CD, Loeber JG, Kneisser I, Saadallah A, Borrajo GJC, et al. Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Semin Perinatol.* 2015;39(3):171–87.
- Loeber JG, Burgard P, Cornel MC, Rigter T, Weinreich SS, Rupp K, et al. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 1 - From blood spot to screening result. *J Inherit Metab Dis.* 2012;35(4):603–11.
- Simon A, Groselj U, Tansek MZ, Bicek A, Oblak A, Zupancic M, et al. Newborn screening in Slovenia. *Zdr Var.* 2015;54(2):86–90.
- Groselj U, Tansek MZ, Simon A, Angelkova N, Anton D, Baric I. Newborn screening in southeastern Europe. *Mol Genet Metab* Groselj U, Tansek MZ, Simon A, et al. *Newborn Screen Southeast Eur Mol Genet Metab* 2014; 113 42–45. 2014;113(1–2):42–5.
- Newborn blood spot test.
- U.S. Department of Health and Human Services. Recommended uniform screening panel [Internet]. [cited 2016 Aug 5]. Available from: <https://www.hrsa.gov/advisorycommittees/mchbadvisory/heritabledisorders/recommendedpanel/index.html>
- Applegarth DA, Toone JR, Lowry RB, Frer C. Incidence of Inborn Errors of Metabolism in British Columbia, 1969 – 1996. *Pediatrics.* 2000;105(1):1–6.
- Harms E, Olgemöller B. Neonatal screening for metabolic and endocrine disorders. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108(1–2):11–21.
- Lindner M, Ho S, Fang-Hoffmann J, Hoffmann GF, Kölker S. Neonatal screening for glutaric aciduria type I: strategies to proceed. *J Inher Metab Dis.* 2006;29(2–3):378–82.
- Derk TS, Boer TS, van Assen A, Bos T, Ruiter J, Waterham HR, et al. Neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in The Netherlands: the importance of enzyme analysis to ascertain true MCAD deficiency. *J Inher Metab Dis.* 2008;31(1):88–96.
- Lindner M, Hoffmann GF, Matern D. Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting. *J Inher Metab Dis.* 2010;33(5):521–6.
- Simon A, Repic Lampret B, Groselj U, Zerjav Tansek M, Kovac J, Perko D, et al. Next generation sequencing as a follow-up test in an expanded newborn screening programme. *Clin Biochem.* 2018;52:48–55.

# Personalizirana stopenjska laboratorijska diagnostika vrojenih bolezni presnove

**Barbka Repič Lampret**

UKC Ljubljana, Pediatrična klinika, Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko, Ljubljana, Slovenija

## UVOD

Personalizirana medicina oziroma bolniku prilagojena medicina predstavlja model zdravstvene obravnave v preventivni, diagnostiki in zdravljenju, ki je osredotočen na posameznega bolnika. Ta model oziroma obravnava bolnika želi prepozнатi pravega bolnika, pravočasno, uvesti pravo zdravljenje v ustreznih odmerkih. Personalizirana medicina upošteva vpliv sprememb celotnega profila označevalcev, ki so značilni za posameznega bolnika. Primer, pri katerem merjenje sprememb presnovnega profila omogoča pravočasno prepoznavo bolnika in uvedbo ustrenega zdravljenja, je tudi diagnostika vrojenih bolezni presnove (1).

## VROJENE BOLEZNI PRESNOVE

Vrojene bolezni presnove so individualno redke, heterogene bolezni. Njihova incidenca je med  $1:10^4$  (npr. fenilketonuriјa) in  $1:10^6$  živorojenih otrok. Kljub temu, da so posamezne bolezni presnove redke, pa celotna skupina prizadene veliko število posameznikov, ki potrebujejo intenzivno, običajno vseživljenjsko obravnavo. Vrojene motnje presnove spadajo v skupino bolezni z genetsko osnovo. Pri večini teh bolezni pride do napake v genu, ki kodira encim, potreben za pretvorbo določenega substrata ali beljakovino, potrebno za prenos presnovkov. Posledica te napake je kopiranje presnovkov, ki so po navadi toksični, oziroma primanjkljaj končnih produktov razgradnje, ki so v nekaterih primerih esencialni. Klinične slike niso vedno značilne za

posamezno motnjo, saj je lahko vpleteneih več organskih sistemov. Te se lahko pokažejo takoj po rojstvu ali pa šele kasneje, v redkih primerih celo v odrasli dobi. V kasnejšem obdobju lahko bolezen izbruhne nenadoma ali pa napreduje postopoma. Zgodnja prepoznavna bolezni in ustrezno zdravljenje sta zelo pomembna, saj lahko v nekaterih primerih z ustrenim ukrepanjem preprečimo nastanek trajnih poškodb ali celo smrt bolnika (2, 3). Večino vrojenih motenj presnove isčemo s selektivnim laboratorijskim presejanjem otrok ob klinični domnevi, da gre za motnjo presnove, glede na družinsko anamnezo ali osnovne laboratorijske teste. Določeno število bolezni pa lahko odkrijemo s presejanjem novorojencev.

## LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA PRESNOVNEGA OBOLENJA

Laboratorijska diagnostika vrojenih motenj presnove je hitro razvijajoče se in obsežno področje. Temelji na identifikaciji enega ali več presnovkov, ki se kopirajo in so značil-

ni za posamezno motnjo. Diagnozo je nato treba potrditi z encimsko ali genetsko analizo.

**Osnovne preiskave krvi** nam že lahko pokažejo biokemične značilnosti, ob katerih moramo pomisliti tudi na presnovno motnjo. To so presnovna acidoza, hiperamoniemija, hipoglikemija, laktacidemija, ketonurija, povečana anionska vrzel, nepojasnjena nevtropenija ali megaloblastna anemija, visoka vrednost jetrnih encimov, nizka vrednost sečnine, visoka vrednost uratov.

**Enostavni presejalni testi** za dokazovanje kopičenih presnovkov v urinu so široko dostopni, vendar slabo občutljivi in specifični, nas pa lahko usmerijo k nadaljnjam bolj specifičnim preiskavam. Temeljijo na barvnih reakcijah skupin sorodnih presnovkov (4, 5).

Odločilen del diagnostike pri selektivnem presejanju presnovnega obolenja so naslednje preiskave (5):

**Kvantitativna analiza prostih aminokislin** v serumu, urinu in likvorju. Analiza poteka z ionsko izmenjalno kromatografijo (postkolonska detekcija z ninhidrinom), v zadnjem času pa jo zamenjuje tandemksa masna spektrometrija (kvantifikacija s stabilnimi izotopsko označenimi internimi standardi). Analiza aminokislin je pomembna pri diagnostiki motenj v presnovi aminokislin in pri spremljanju zdravljenja bolnikov.

**Kvalitativna določitev organskih kislin** v urinu. Organske kisline so neaminske karboksilne kisline, nastajajo v intermediarni presnovi aminokislin, ogljikovih hidratov, maščobnih kislin, purinov in pirimidinov. Izločajo se v urinu. Ločevanje temelji na različni hlapnosti spojin, analizo izvajamo s plinskim kromatogramom, sklopljenim z masno selektivnim detektorjem. Hlapne komponente vzorca se selektivno zadržujejo na stacionarni fazi kolone in pod vplivom mobilne faze (dušik, helij, vodik) potujejo skozi kolono. Masno selektivni detektor posname masni spekter posamezne komponente, ki se ionizira v ionskem izvoru. Ti spektri se uporabljajo za identifikacijo ločenih komponent. Identifikacija spojin temelji na primerjavi masnih spektrov posamezne spojine s knjižničnimi spektri.

**Analiza acilkarnitinov** v krvnem madežu s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS), ki omogoča zaznavo velikega števila molekul, kot tudi določitev njihove koncentracije. Metoda je izredno hitra, zanesljiva in selektivna. Temelji na učinkoviti ekstrakciji analitov iz filtrirnega papirja, čemur sledi derivatizacija do butil estrov, in masni analizi.

Za zagotovitev natančne in ponovljive kvantifikacije analitov se uporablajo stabilni, izotopsko označeni (devterirani) interni standardi. Za kvantifikacijo je pomembno, da je količina natančno določena. Količina krvi v izrezanem krvnem madežu je odvisna od premera izrezanega kroga, hematokrita vzorca in vrste filtrirnega papirja. Pri uporabi filtrirnega papirja Whatman 903 in 3-milimetrskem krogu krvnega madeža predpostavimo, da je volumen krvi 3,1 µL. Metoda določitve aminokislin in acilkarnitinov v krvnem madežu je semikvantitativna, saj se količina krvi spreminja od vzorca do vzorca glede na hematokrit (2,2–3,3 µL).

Vzorec se ionizira preden pride do masnega spektrometra. Tandemske masne spektrometer (MS/MS sistem) ima zaporedno vezana dva masna analizatorja, med njima pa je nameščena kolizijska celica. V prvem masnem analizatorju se ioni, ki izvirajo neposredno iz ionizatorja, ločijo na podlagi mase in naboja. Ko pridejo do kolizijske celice, s pomočjo inertnega plina razpadajo na manjše fragmente. Zatem drugi masni analizator fragmente zopet loči na podlagi mase in naboja. Sledi detekcija.

Metoda se uporablja pri diagnostiki bolnikov z organskimi acidemijami in s prirojenimi motnjami v presnovi maščobnih kislin. Vpeljava tandemkske masne spektrometrije je močno vplivala na pristop k presejanju novorojenčev, saj omogoča detekcijo velikega števila presnovkov (in s tem veliko število diagnoz) v enem analitskem postopku iz enega vzorca krvnega madeža.

Pri interpretaciji rezultatov je zelo pomembno, da so na voljo tudi informacije o kliničnem stanju bolnika, biokemičnih značilnostih, o zdravilih, ki jih bolnik jemlje, ter drugih bolezenskih stanjih. Za postavitev diagnoze je v nekaterih primerih treba urin in kri za analizo odvzeti med akutno fazo bolezni, saj ključni presnovki niso vedno povisani.

V nekaterih primerih so diagnostično pomembni tudi presnovki, prisotni v zelo nizkih koncentracijah. V tem primeru imajo bolniki blage težave ali pa se znaki bolezni pojavitjo le ob hujših naporih in stresu.

## LITERATURA

1. Barker R. Precision medicine: what's all the fuss about? *Scand J Clin Lab Invest* 2016; 245: S2-S5.
2. Saudubray JM. Clinical Approach to Inborn Errors of Metabolism in Pediatrics. In: Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH, editors. *Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and Treatment*. Springer, 2012: 3–52.
3. Burton BK. Inborn errors of metabolism in infancy: a guide to diagnosis. *Pediatrics* 1998; 102: E69.
4. Blau N, Blaskovics ME, Duran M. Simple Tests in Urine and Blood. In: Blau N, Blaskovics ME, Duran M, Gibson KM, editors. *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. Springer, 2003, 3-10.
5. Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM, Dionisi-Vici C, editors. *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases*. Springer, 2014.

# Genetska diagnostika vrojenih bolezni presnove

Katarina Trebušak Podkrajšek

UKC Ljubljana, Pediatrična klinika, Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko, Ljubljana, Slovenija  
Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo, Ljubljana, Slovenija

## POMEN GENETSKIH PREISKAV PRI DIAGNOSTIKI VROJENIH BOLEZNI PRESNOVE

Genetsko testiranje je širok pojem z zelo različnimi opredelitvami. Po eni izmed njih gre za preiskave človeške DNA, RNA in kromosomov z namenom ugotoviti z boleznimi povezane genotipe, mutacije ali kariotipe za klinične namene in vključujejo tudi ugotavljanje genetskih sprememb, ki niso nujno ključne za opredelitev posamezne bolezni (1). Cilj genetskega testiranja je torej opredelitev genetskih sprememb. Genetska sprememba je priporočen nevtralni izraz, ki zajema širše uporabljenia in v medicinski genetiki manj priporočena izraza mutacija (patološka sprememba) in polimorfizem (sprememba, prisotna v več kot 1 % populacije) (2). Genetske spremembe se izražajo kot fenotipske razlike med posamezniki, prirojene bolezni oziroma nagnjenost k bolezni ali kot spremenjen odziv posameznika na združila, vplive okolja. Pomemben del genetskega testiranja je genetsko svetovanje. Genetske preiskave se lahko izvajajo le ob podpisanim obrazcu o privolitvi po poučitvi, s katerim preiskovanec oziroma starši izkažejo strinjanje s preiskavo, razumevanje značilnosti preiskave, njenih možnih rezultatov in posledic.

Genetske preiskave se pri vrojenih boleznih presnove (VBP), podobno kot pri ostalih boleznih, uporabljajo kot *diagnostične preiskave*. V tem primeru lahko potrdimo ali ovržemo klinično diagnozo in s tem genetsko bolezen pri simptomatskem posamezniku. Posebno pomembne so diagnostične genetske preiskave v primerih, ko so klinični znaki nejasni ali ne popolnoma izraženi. V družinah z VBP in pri katerih je že ugotovljena genetska sprememba, ki je vzrok za bolezen, lahko izvedemo *predisimptomatske genetske preiskave*. V tem primeru ocenimo verjetnost razvoja določene bolezni pri posamezniku, ki nima izraženih kliničnih znakov. Takšne preiskave so še posebno pomembne v primerih,

ko s kliničnim ukrepanjem razvoj bolezni ali njenih zapletov lahko preprečimo ali vsaj upočasnímo. V družinah z VBP in pri katerih je že ugotovljena genetska sprememba, lahko ugotavljamo tudi *nosilstvo bolezenske genetske spremembe*. To pa nato omogoči odločitev glede *predrojstvene preiskave*, ki ugotavlja genetsko bolezen ploda (3). Genetske preiskave pri VBP se uporabljajo tudi kot *potrditveni test presejalnih preiskav pri novorojenčku* (4). Na ta način je mogoče izboljšati presejalno testiranje, saj se zmanjša število lažno pozitivnih rezultatov. V nekaterih primerih pa glede na genotip lahko že takoj napovemo, ali bo bolezen potekala z blažjim ali hujšim potekom, kot na primer pri pomanjkanju karnitin-palmitoiltransferaze 2 (CPT 2) in pomanjkanju zelo-dolgovrižne-acil-CoA-dehidroge-naze VLCAD (5).

Večina VBP se deduje avtosomno recessivno, redkeje avtosomno dominantno, X-vezano ali z mitohondrijskim dedovanjem. Pri večini VBP genetske preiskave niso nujne za dokončno potrditev klinične diagnoze. To namreč omogočajo že preiskave organskih kislin, aminokislin, acilkarnitinov in določitev aktivnosti okvarjenega encima. V teh primerih je genetska diagnostika pomembna predvsem za opredelitev genetskega vzroka, ki nato omogoča določitev nosilstva sprememb v družini in opredelitev tveganja za bolezen pri potomcih. V nekaterih primerih pa je genetska diagnostika ključna za potrditev klinične domneve, da gre za VBP. Tak primer je pomanjkanje ornitin transkarbamilate, pri kateri bi bila za določanje encimske aktivnosti potrebna biopsija jeter. Genetska diagnostika je lahko ključna tudi za personalizirano odločitev glede zdravljenja in vodenja bolezni. Primer je fenilketonurija, pri kateri opredelitev bolezenske spremembe lahko neposredno vpliva na vode-

nje in zdravljenje bolezni. Če ima bolnik bolezensko spremembo v genu *PAH*, ki je odzivna na tetrahidrobiopterin (BH4), lahko sicer vseživljensko strogo dieto vsaj delno nadomestimo z zdravljenjem z BH4 (6). Drug primer personalizirane laboratorijske diagnostike je Fabryeva bolezen, pri

kateri glede na tip bolezenske spremembe pri posamezniku lahko pričakujemo klasično ali milo obliko bolezni. To pa je pomembno pri odločitvi za encimsko nadomestno terapijo, ki jo je treba uvesti čim prej, to pomeni preden pride do nepovratne okvare organov (7).

## METODE GENETSKIH PREISKAV PRI VROJENIH BOLEZNIH PRESNOVE

Pregled metod, ki jih uporabljamo v genetski diagnostiki VBP, je opisan v rokopisu Wertheim-Tysarowske in sodelavcev (8). Prva stopnja molekularno genetskih preiskav je izolacija DNA oz. RNA. Najpogosteje se za genetsko diagnostiko uporablja DNA, izolirana iz levkocitov periferne krvi ali brisa ustne sluznice. Za prenatalno diagnostiko se uporablja DNA, izolirana iz horionskih resic ali kultiviranih celic amnijiske tekočine. Osnova večine nadaljnjih metod je pomnoževanje z verižno reakcijo s polimerazo. Izbrane namnožene odseke nato lahko analiziramo s presejalnimi metodami, kot je analiza talilne krivulje visoke ločljivosti (HRM) ali visokotlačna tekočinska kromatografija z denaturacijo (DHPLC). Če analiziramo posameznega bolnika ali majhno skupino bolnikov, pa pomnoženim odsekom neposredno določimo nukleotidno zaporedje. Določitev nukleotidnega zaporedja je zelo učinkovit postopek prepoznavanja vseh sprememb v analiziranih regijah. Pri tem najpogosteje uporabljamo metodo po Sangerju, ki omogoča sekvenciranje izbranih kratkih odsekov izbranega gena ali majhnega števila genov, ki so povezani z izbrano VBP. V zadnjem času se vse več uporablja tudi metode sekvenciranja naslednje generacije (NGS), ki omogočajo sočasno tarčno sekvenciranje več tisoč izbranih genov ali sekvenciranje celotnega eksoma/genoma posameznika. V primeru potrjevanja klinične domneve, da gre za VBP, ali potrjevanja rezultatov neonatalnega testiranja za VBP, NGS omogoča sočasno analizo več genov, povezanih s posamezno VBP, ali celo analizo vseh genov, povezanih z vsemi VBP (9). Pri večini VBP je treba analizirati več genov ali posamezne velike gene, zato je sekvenciranje po Sangerju časovno zamudno in drago (10). Uporaba NGS v prvi fazi presejalnega testiranja za VBP namesto MS-MS trenutno še ni uveljavljena, predvsem zaradi visoke cene, dolgega časa analize in kompleksne interpretacije rezultatov (11).

Rezultat sekvenciranja je nukleotidno zaporedje, ki ga primerjamo z zaporedjem referenčnega gena v genski banki,

ter tako določimo mesto razlike v zaporedju. Pomemben del molekularno genetske diagnostične preiskave je ustreza in pravilna interpretacija rezultatov analize. Treba je pravilno ovrednotiti pomen opredeljene genetske spremembe za funkcijo proteina in s tem za razvoj določene bolezni. Pri tem si pomagamo z različnimi bazami podatkov in objavljeno literaturo. Med najpomembnejšimi bazami podatkov o znanih genetskih boleznih je OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), kjer so zbrani podatki o boleznih in genih, ki so odgovorni za njihov nastanek (<http://ncbi.nlm.nih.gov/Omim>). Pomembna baza podatkov je tudi HGMD (Human Gene Mutation Database), kjer so zbrane vse objavljene spremembe, povezane z razvojem določene bolezni (<http://www.hgmd.org/>). Baze, ki vsebujejo podatke o variabilnosti človeškega genoma (navidezno zdrave populacije) so dbSNP (angl. The Single Nucleotide Polymorphism database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ SNP/>), gnomAD Browser (angl. The Genome Aggregation Database, <http://gnomad.broadinstitute.org/>) in Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>). V primeru sprememb, ki predhodno še niso bile opisane v splošni populaciji ali pri bolnikih, za napoved njihovega pomena pri razvoju bolezni uporabimo *in silico* predikcijska orodja, kot so Swift ([http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_enst\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html)), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) in MutationTaster ([www.mutationtaster.org](http://www.mutationtaster.org)) CADD (<http://cadd.gs.washington.edu/>) ter druga.

Metoda MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) je od ligacije sond odvisna multipleksna metoda PCR, ki omogoča opredelitev genskih delecij in insercij, ki so prevelike, da bi jih lahko zaznali s klasičnim sekvenciranjem, hkrati pa premajhne, da bi jih lahko določili s klasičnimi citogenetskimi metodami, kot so kariotipizacija, FISH (Fluorescentna In Situ Hibridizacija) ali primerjalna genomska hibridizacija z uporabo mikromrež (aCGH).

## ZAKLJUČEK

Genetske preiskave imajo pomembno mesto v laboratorijski diagnostiki VBP, trenutno predvsem pri potrjevanju rezultatov drugih laboratorijskih preiskav in pri prepoznavanju genetskega vzroka bolezni, ki je osnova za primerno

genetsko svetovanje. Z razvojem metod sekvenciranja naslednje generacije pa pričakujemo, da se bo vloga genetskih preiskav še povečala.

## LITERATURA

1. Sequeiros J, Paneque M, Guimarães B, Rantanen E, Javaher P, Nippert I et al. The wide variation of definitions of genetic testing in international recommendations, guidelines and reports. *J Community Genet.* 2012;3(2):113-2.
2. den Dunnen JT, Dagleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan Jet al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat.* 2016;37(6):564-9.
3. Rudolf G, Peterlin B. Uporaba DNK genetskega testa v medicini. *Zdrav Vestn* 2009;78:65-71.
4. Smon A, Repic Lampret B, Groselj U, Zerjav Tansek M, Kovac J, Perko Det al. Next generation sequencing as a follow-up test in an expanded newborn screening programme. *Clin Biochem.* 2018;52:48-55.
5. Morris AAM, Spiekerkoetter U. Disorders of mitochondrial fatty acid oxidation and related metabolic pathways. In: Saudubray J-M, Van den Berghe G, Walter JH, editors. *Inborn Metabolic Diseases.* 5th ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2012. p.201-16.
6. Tansek MZ, Groselj U, Murko S, Kobe H, Lampret BR, Battelino T. Assessment of tetrahydrobiopterin (BH(4))-responsiveness and spontaneous phenylalanine reduction in a phenylalanine hydroxylase deficiency population. *Mol Genet Metab.* 2012;107(1-2):37-42.
7. Biegstraaten M, Arngrímsson R, Barbey F, Boks L, Cecchi F, Deegan PB et al. Recommendations for initiation and cessation of enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: the European Fabry Working Group consensus document. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10:36
8. Wertheim-Tysarowska K, Gos M, Sykut-Cegielska J, Bal J. Genetic analysis in inherited metabolic disorders-from diagnosis to treatment. Own experience, current state of knowledge and perspectives. *Dev Period Med.* 2015;19(4):413-31.
9. Qian J, Wang X, Liu J, Zhong J, Le Y, Melchior Tellier LCA, et al. Applying targeted next generation sequencing to dried blood spot specimens from suspicious cases identified by tandem mass spectrometry-based newborn screening. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2017 Aug;30(9):979-88.
10. Bhattacharjee A, Sokolsky T, Wyman SK, Reese MG, Puffenberger E, Strauss K, et al. Development of DNA Confirmatory and High-Risk Diagnostic Testing for Newborns Using Targeted Next-Generation DNA Sequencing. *Genet Med.* 2014;17(5):337-47.
11. Landau YE, Lichter-Konecki U, Levy HL. Genomics in newborn screening. *J Pediatr.* 2014;164(1):14-9.

# Stopenjska laboratorijska diagnostika fenilketonurije

**Žiga Iztok Remec**

UKC Ljubljana, Pediatrična klinika, Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko, Ljubljana, Slovenija

Fenilketonurija (PKU) (MIM# 261600) je avtosomno recessivna bolezen, ki je posledica prirojene motnje v presnovi aminokisline fenilalanin (Phe). Vzrok za PKU je pomanjkanje aktivnosti fenilalaninske hidroksilaze (PAH), encima, ki katalizira pretvorbo fenilalanina v tirozin, pri tem pa kot katalitski kofaktor uporablja tetrahidrobiopterin (BH4). Glavna presnovna pot fenilalanina je njegova hidroksilacija v tirozin, zaradi okvare encima PAH pa se fenilalanin kopiči v telesnih tekočinah in tkivih, kar povzroča povišano raven fenilalanina v krvi, tako imenovano hiperfenilalaninemijo (HFA) (1). Fenilketonurija predstavlja vzorčni primer vrojenih bolezni presnove, saj so prav na primeru PKU prvič razjasnili presnovni vzrok za duševno manjrazvitost (leta 1943), nekaj let za tem (1953) pa so prvič uspešno omilili simptome presnovne bolezni z dieto. Leta 1963 so za fenilketonurijo prvič uvedli presejanje novorojencev.

Gen *PAH* (MIM# 612349), ki kodira fenilalaninsko hidroksilazo, se nahaja na dolgem (q) kraku kromosoma 12 v področju 23.2 in sestoji iz 13 eksonov. V bazi podatkov PAHdb (Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase) je trenutno blizu 600 mutacij gena *PAH*, ki imajo za posledico različne stopnje pomanjkanja katalitske aktivnosti encima PAH in s tem različne fenotipske značilnosti bolnikov s PKU (2). Encim PAH je homotetramerni encim, pri katerem je vsaka podenota sestavljena iz treh domen: N-terminalne regulatorne domene (aminokislinski ostanki 1–142), osrednje katalitske domene, ki zajema BH4 vezavno mesto in železov atom, ki je potreben za pretvorbo substrata (Phe) v tirozin, in C-končne oligomerizacijske domene (3, 4). Bolezenske spremembe v genu *PAH* najpogosteje povzročijo nepravilno zvitje terciarne strukture proteina, kar privede do nepravilnega delovanja encima in to je tudi glavni razlog za pomanjkljivo aktivnost ter posledično povišano koncentracijo fenilalanina. Gen se izraža večinoma samo v jetrih in ledvicah, kjer so translacijski produkti v fizioloških

pogojih v ravnotesju med dimerno in tetramerno obliko. V 1–2 % povzročajo HFA vzročne spremembe genov za encime, ki sodelujejo v tvorbi ali regeneraciji BH4, kofaktorja encima PAH. Rezultat teh sprememb je t.i. maligna PKU, ki jo je treba izključiti pri vseh na novo odkritih bolnikih s HFA.

Vpliv bolezenskih sprememb gena *PAH* je mogoče ugotovljati na treh fenotipskih ravneh, značilnih za PKU: na ravni zgradbe in delovanja encima PAH (encimski fenotip), na ravni presnovnega fenotipa, ki se izraža kot raven Phe v krvi in na njem temelji klinična razvrstitev PKU in blage HFA, ter na ravni kliničnega fenotipa, ki je opisan kot stopnja kognitivnega razvoja. Glede na koncentracijo fenilalanina v krvi določimo presnovni fenotip bolnikov s PKU, ki zajema štiri razrede: klasično fenilketonurijo, zmerno fenilketonurijo, blago fenilketonurijo in blago hiperfenilalaninemijo (1, 5).

Eden izmed glavnih simptomov nezdravljene PKU je huda duševna manjrazvitost, ki je posledica nevrotoksičnega vpliva fenilalanina na razvoj in delovanje možganov. Glavna posledica povišane koncentracije fenilalanina je hipomielinizacija in demielinizacija nevronov. PKU povezujejo tudi z razvojem drugih simptomov in znakov, kot so mikrocefalija, nizka rast in končna višina, ekcemi, hipopigmentacija (zaradi pomanjkanja tirozina), epilepsija, avtizem in različni psihiatrični simptomi. Nasprotno pa imajo bolniki z blago HFA povprečen IQ in so brez izrazitih kliničnih znakov (1, 6).

Zdravljenja samega vzroka bolezni še ne poznamo, zato je to usmerjeno v zniževanje povišanih koncentracij Phe (pod 360 µmol/L), ki je nujno pri bolnikih z vsemi oblikami fenilketonurije, ne pa pri bolnikih z blago HFA. Vzdrževanje koncentracij fenilalanina v krvi pod 260 µmol/L je nujno tudi pri nosečnicah za preprečitev maternalne fenilketonurije (7) we did a literature search, critical appraisal, and evidence grading according to the Scottish Intercollegiate Gui-

delines Network method. We used the Delphi method when little or no evidence was available. From the 70 recommendations formulated, in this Review we describe ten that we deem as having the highest priority. Diet is the cornerstone of treatment, although some patients can benefit from tetrahydrobiopterin (BH4). Pri preprečevanju težkih posledic bolezni ima ključno vlogo zgodnja uvedba dietnega zdravljenja, s kontroliranim vnosom fenilalanina ter s hkratno zagotovitvijo zadostnega vnosa ostalih aminokislin z ustreznimi prehranskimi preparati (1, 7)we did a literature search, critical appraisal, and evidence grading according to the Scottish Intercollegiate Guidelines Network method. We used the Delphi method when little or no evidence was available. From the 70 recommendations formulated, in this Review we describe ten that we deem as having the highest priority. Diet is the cornerstone of treatment, although some patients can benefit from tetrahydrobiopterin (BH4). Zadnje čase se uveljavlja tudi dopolnilno zdravljenje z BH4, na katerega je odzivna večina bolnikov z blago HFA, žal pa le manj kot 10 % vseh bolnikov s klasično PKU. Na zdravljenje z BH4 so najbolj odzivni bolniki z bolezenskimi spremembami v genu *PAH*, ki omogočajo vsaj delno aktivnost spremenjenega encima PAH. Povezava med genotipom PAH in odzivnostjo na BH4 še ni popolnoma znana. Zanesljivo jo lahko izključimo le pri bolnikih brez encimske aktivnosti in zanesljivo pričakujemo pri bolnikih z blago HFA. BH4 pri odzivnih bolnikih deluje predvsem kot šaperon, ki olajša pravilno zvijanje spremenjenega encima, ter ga stabilizira v tetramerni obliki. Preprečuje tudi agregacijo nepravilno zvitih monomerov in s tem njihovo proteolitsko razgradnjo ter termalno inaktivacijo (8). Zaradi možnega pozitivnega učinka morajo biti bolniki pred uvedbo zdravljenja testirani na odzivnost na zdravljenje z BH4. Testiranje naredimo z obremenitvenim testom, ki poteka ob nekajdnevnom normalnem vnosu beljakovin s peroralnim dodatkom BH4. Kot merilo odzivnosti se v večini centrov upošteva padec vrednosti Phe po 24 urah za vsaj 30 % glede na izhodiščno vrednost (4, 9). Razvoj novih načinov zdravljenja poteka v smeri dietnega zdravljenja z dolgočasnimi nevtralnimi aminokislinami (angl. LNAA), zdravljenja z encimom fenilalanin-amonijak-liaza (PAL) in uvedbe genske terapije (2).

Laboratorijska diagnostika fenilketonurije poteka na treh ravneh, in sicer z meritvami koncentracije presnovnih produktov (fenilalanin in tirozin), merjenjem encimske aktivnosti in analizo gena *PAH*.

Koncentracijo fenilalanina določamo z encimskimi, fluorimetričnimi in kromatografskimi metodami. Pri encimskem določanju koncentracije se fenilalanin spere iz posušenega krvnega madeža, nato pa ob prisotnosti PAH in koencima NAD<sup>+</sup> preide v fenilpiruvat in NADH. Slednji omogoči spremembo prisotnega akceptorja elektronov, brezbarvnega tetrazolia, vobarvan formazan, ki je sorazmeren koncentraciji Phe. Vzorcu nato izmerimo absorbanco pri 570 nm.

Fluorimetrično določanje fenilalanina v serumu oziroma plazmi temelji na dveh zaporednih kemijskih reakcijah. V prvi stopnji segrevamo reakcijsko zmes fenilalanina, ninhidrina, in L-levcil-L-alanina v kislem ftalatnem pufru (pH 5,8), pri čemer nastaja prekurzor, ki se v drugem delu postopka pretvori v fluorokrom. Drugi del reakcije je strogo odvisen od temperature in pH ter je optimalen pri 60 °C v pirofosfatnem pufru, pH 8,0. Fluorescenco merimo pri 475 nm, valovna dolžina ekcitacije pa je 365 nm.

Z razvojem kromatografskih metod in masne spektrometrije sta bili mogoči detekcija in kvantifikacija velikega števila razmeroma zelo raznolikih analitov v istem vzorcu z isto metodo. Aminokisline določamo s številnimi metodami, kot so: tandemksa masna spektrometrija, plinska kromatografija, plinska kromatografija z masno spektrometrijo, ionsko izmenjevalna kromatografija s postkolonsko derivatizacijo z ninhidrinom in visokotlačna tekočinska kromatografija z reverzno fazo. V našem laboratoriju določamo aminokisline v različnih vzorcih (plazma/serum, urin, likvor, krvni madež) s tekočinsko kromatografijo, povezano s tandemskim masnim spektrometrom. Glavne prednosti metode so sočasno merjenje velikega števila diagnostično pomembnih aminokislin, kratki časi analize (20 minut na vzorec iz plazme in < 2 minuti iz krvnega madeža), merimo samo analite, ki jih predhodno opredelimo v metodi (ni interferenc z drugimi analiti) in zelo natančna kvantifikacija, ker vsak analit primerjamo z izotopsko označenim internim standardom (10)the most conventional method to quantify physiological amino acids consists in ion exchange chromatography (IEC. Analiza aminokislin nam poleg postavitev diagnoze poda tudi podatke o poteku zdravljenja – o uspešnosti predpisane diete in prehranskem stanju bolnika. Spremljanje ravni aminokislin je pomembno pri bolnikih, ki imajo zaradi presnovne bolezni dieto z zmanjšanim vnosom beljakovin ali posameznih aminokislin, saj moramo zagotoviti, da vnos esencialnih aminokislin ne pada pod spodnjo mejo. Tako pri bolnikih s fenilketonurijo spremljamo koncentracije

fenilalanina, tirozina in ostalih esencialnih aminokislin, s čimer ocenimo ustreznost diete (ustrezno razmerje med vnosom naravnih beljakovin in dodatka preparata aminokislin brez fenilalanina). Pri interpretaciji rezultatov pa se moramo zavedati, da na vrednosti aminokislin v vzorcu vplivajo tudi pravilen odvzem, kontaminacija ter druge bolezni in stanja bolnika. Še posebno je pomemben pravilen odvzem vzorca na filtrirni papir, ki ga opravijo starši na domu in pošljejo v laboratorij na redne mesečne kontrole.

Metoda določanja aminokislin in acilkarnitinov iz posušenega madeža krvi na filtrirnem papirju se uporablja z namenom zgodnjega odkrivanja motenj v presnovi aminokislin in maščobnih kislin. Kromatografska kolona pri tej metodi ni potrebna. Metoda je izredno hitra, zanesljiva in selektivna, dolžina merjenja je le 1,7 min. Temelji na učinkoviti ekstrakciji presnovkov iz filter papirja, čemur sledita derivatizacija do butil estrov in masna analiza. Za kvantifikacijo se uporabljojo stabilni, izotopsko označeni (devterirani) interni standardi (11).

V Sloveniji od leta 1979 poteka presejanje novorojenčev za fenilketonurijo, in sicer v laboratoriju Klinike za nuklearno medicino, kjer za presejanje fenilketonurije od leta 1992 uporabljojo fluorimetrično metodo (12). Odkritju bolezni na neonatalnem presejanju pri nekem pacientu sledi opredeli-

tev pacientovega presnovnega fenotipa in genotipa. Za diagnostiko encimske aktivnosti PAH je potrebna biopsija jetre (10–30 mg tkiva), ki pa je upravičena le za diagnostiko, ne pa za raziskovalne namene (1).

Poleg ugotavljanja encimske aktivnosti je za opredelitev PKU pri posameznem pacientu pomembna tudi genetska opredelitev mutacij v genu *PAH*. Genetska opredelitev vzroka za PKU je pomembna predvsem zaradi optimizacije zdravljenja – terapije, genetskega svetovanja staršem in morebitne predrojstne diagnostike v naslednjih nosečnostih. Molekularno-genetska diagnostika se izvaja v glavnem s klasično sekvenčno reakcijo z dideoksi metodo s fluorescenčno označenimi dideoksi nukleotidi in detekcijo s kapilarno elektroforezo. Analiza in interpretacija rezultatov se začneta s primerjavo vzorčnega zaporedja s sekvcencami iz baz normalnih zaporedij (GeneBank). Ugotovljene spremembe preverimo v podatkovnih bazah humanih mutacij (HGMD, ClinVar), bazi mutacij gena *PAH* (PAHdb) in bazah sprememb v splošni populaciji (dbSNP, ExAc, idr.). Če odkrijemo še neopisano spremembo, jo identificiramo in poimenujemo ter preverimo segregacijo v družini. V genu *PAH* predstavljajo 3–5 % sprememb tako imenovane velike delekcije in duplikacije, ki jih s klasičnim sekvenciranjem po Sangerju ne moremo opredeliti, za njihovo detekcijo je bolj primerna metoda od ligacije odvisno hkratno pomnoževanje sond (MLPA).

## LITERATURA

- Grošelj U, Battelino T, Podkrajšek KT. Analiza gena za fenilalaninsko hidroksilazo in ugotavljanje povezave s fenotipom pri bolnikih s fenilketonurijo: doktorsko delo. U: Grošelj; 2012.
- Scriver CR. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. Vol. 28, Human Mutation. 2007. p. 831–45.
- Waters PJ. How PAH gene mutations cause hyper-phenylalaninemia and why mechanism matters: Insights from in vitro expression. Vol. 21, Human Mutation. 2003. p. 357–69.
- Blau N, Erlandsen H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. Vol. 82, Molecular Genetics and Metabolism. 2004. p. 101–11.
- Scriver CR, Waters PJ. Monogenic traits are not simple: Lessons from phenylketonuria. Vol. 15, Trends in Genetics. 1999. p. 267–72.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), 2018. World Wide Web URL: <https://omim.org/>.
- van Spronsen FJ, J van Wegberg a M, Blau N, van Spronsen FJ, van Weberg AM, Ahring K, et al. Key European guidelines for the diagnosis and management of patients with phenylketonuria. LANCET Diabetes Endocrinol. 2017;8587(16):1–14.
- Pey AL, Ying M, Cremades N, Velazquez-Campoy A, Scherer T, Thöny B, et al. Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. J Clin Invest. 2008;118(8):2858–67.
- Blau N, Duran M, Gibson KM, Vici CD. Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases. Springer Berlin Heidelberg; 2014.
- Filee R, Schoos R, Boemer F. Evaluation of physiological amino acids profiling by tandem mass spectrometry. JIMD Rep. 2014;13:119–28.
- Šmon A, Grošelj U, Žerjav Tanšek M, Biček A, Oblak A, Zupančič M, et al. Newborn Screening in Slovenia / Presejanje Novorojenčev V Sloveniji. Slov J Public Heal. 2015;54(2):86–90.
- Battelino T, Kržišnik C, Pavlin K. Early detection and follow up of children with phenylketonuria in Slovenia. Zdr Vestn. 1994;63(1):25–8.





## 02 | Predanalitika

# Poenotenje vodenja kazalnikov kakovosti predanalitske faze po priporočilih IFCC 2016/21; zavrnitvena merila za vzorce

**Lidija Gobec**

Splošna bolnišnica Celje, Oddelek za laboratorijsko medicino, Celje, Slovenija

Delovna skupina za predanalitiko je pripravila predlog poenotena kazalnikov kakovosti za predanalitsko fazo in ga objavila na spletni strani SZKKLM (<http://www.szkklm.si>) pod zavihkom Projekti združenja. Predlog je povzet po priporočilih IFCC Delovne skupine za laboratorijske napake in varnost pacientov (IFCC WG Laboratory Errors and Patient Safety), ki je s projektom MQI (Model of Quality Indicators) začela že l. 2008 in ga je do danes izpopolnjevala tako, da bi kazalniki pokrivali vse faze laboratorijskega procesa in bi bili uporabni za čim širši krog kliničnih laboratorijev. Zadnja revizija njihovih priporočil je izšla januarja 2017 na spletni strani (<http://www.ifcc-mqi.com>), delovna skupina je povzela samo kazalnike za predanalitsko fazo. Vsi kazalniki kakovosti predanalitske faze so podani v preglednici, ki je prav tako povzeta po priporočilih IFCC, z ustrezno kodo in nazivom indikatorja, načinom njihovega javljanja oz. statističnega vodenja ter časom zbiranja podatkov oz. pogostosti statističnega pregleda. Delovna skupina za predanalitiko je v dodatnem stolpcu "Vrste zbiranja podatkov" podrobneje opredelila vrste napak znotraj istega kazalnika kakovosti in podala primere iz laboratorijske prakse, katere napake se uvrščajo v posamezni kazalnik.

Kazalniki kakovosti so po priporočilih IFCC razdeljeni na štiri stopnje prioritete (obvezni, pomembni, priporočljivi, koristni). Delovna skupina za predanalitiko priporoča poenotenje posameznih kazalnikov kakovosti (ne glede na prioritetno po priporočilih IFCC). Izvajanje drugih, posebej označenih kazalnikov priporoča po lastni presoji laboratorija oz. kadar je to za laboratorij ali naročnika pomembno. Laboratorij lahko doda tudi svoje kazalnike, s katerimi spremišča kritična področja svojega dela.

Zavrnitvena merila za vzorce podajajo merila, po katerih morajo laboratoriji zavrniti sprejem neustreznega vzorca za opravljanje preiskav, zavrniti opravljanje določenih preiskav iz vzorca ali zavrniti rezultat že opravljene meritve, kadar je neustreznost vzorca ugotovljena naknadno.

Zavrnitvena merila za vzorce so usklajena z IFCC kazalniki kakovosti predanalitske faze. Vsako zavrnitveno merilo lahko povežemo z ustreznim kazalnikom kakovosti, ki beleži ugotovljeno neskladnost.

Ker je lahko prinesen biološki material enkraten in njegov odvzem neponovljiv, ker je lahko težko pridobljen ali pridobljen z invazivnim postopkom (likvor, punktat, vzorci za TDM, odvzeti ob določenem času, vzorci novorojencev ali majhnih otrok, ...), ker so lahko preiskave nujne in življenskega pomena, je treba pred zavrnitvijo vzorca dobro pretehtati vzroke zanje. Vzorca nikoli ne zavrnemo brez obvestila naročniku. Kadar je možno, z naročnikom uredimo neskladnosti (posredovanje pomanjkljivih podatkov), neskladnost zabeležimo v LIS oz. ustrezno dokumentacijo, vendar vzorca ne zavrnemo.

## LITERATURA

1. IFCC-Working Group „Laboratory Errors and Patient Safety“. Quality Indicators in Laboratory Medicine; Model of Quality indicators, Quality Indicators – Key processes. IFCC WGLEPS: MQI-KP- Revision 1 – January 2017.

# Elektronsko vodenje kazalnikov kakovosti predanalitske faze v LIS

**Lidija Gobec**

Splošna bolnišnica Celje, Oddelek za laboratorijsko medicino, Celje, Slovenija

Kot predanalitske napake se vodijo vse napake, ki jih določajo kazalniki kakovosti, ne glede na to, v katerem času analiznega procesa so bile ugotovljene (ob sprejemu naročila laboratorijskih preiskav, ob sprejemu biološkega materiala, ob pripravi vzorca ali po opravljenih meritvah). V primerjavi z ročnim vodenjem v obliki različnih tabel predstavlja elektronsko vodenje kazalnikov kakovosti bistveno enostavnejši, hitrejši in bolj zanesljiv ter standardiziran način beleženja. Elektronsko lahko vodimo napake znotraj laboratorijskega informacijskega sistema (LIS) ali neodvisno od njega, s posebnimi za to prilagojenimi računalniškimi programi (enega ponuja tudi IFCC). V Sloveniji je možnost elektronskega vodenja predanalitskih napak v laboratorijskem informacijskem sistemu odvisna od ponudnika LIS, ki ga uporablja laboratorij. Podjetje Fin-Pro v informacijskem sistemu Labis ponuja testni modul, ki trenutno še ni uporaben za ta namen in ga bo treba posodobiti z novimi pravili IFCC za vodenje kazalnikov kakovosti. Informacijski sistem Kobis, podjetja Computel, ima izdelan program za vodenje predanalitskih napak od l. 2013, ima pa tudi že izdelan modul za vodenje napak IFCC. V programu je definiran šifrant napak po IFCC, ki uporabniku omogoča hitro izbiro predanalitske napake in matriksa (vzorca), na katerega se napaka nanaša, hkrati pa je možna tudi evidenca zavrnjenih vzorcev. Ob posamezni napaki obstaja možnost izbire med predefiniranimi komentarji, ki se lahko izpišejo na laboratorijski izvid. Program ponuja tudi izračun kazalnikov kakovosti za določeno obdobje.

Za vodenje kazalnikov kakovosti so pomembna enotna pravila vodenja. Kot predanalitske se vodijo vse napake, zradi katerih je bil zavrnjen biološki material ali zavrnjeno opravljanje vsaj ene od naročenih laboratorijskih preiskav v vzorcu. Na izvid pacienta navedemo ustrezni komentar za obrazložitev vzroka zavrnitve. Prav tako se kot predanalitske vodijo tudi vse napake, pri katerih je laboratorijsko osebje s posredovanjem napako odpravilo. K podatkom o pacientu ali na njegov izvid navedemo ustrezni interni komentar o napaki in načinu njenega odpravljanja. Komentarja ni treba posredovati naročniku preiskav. Laboratorij lahko vodi kazalnike kakovosti za predanalitsko fazo po navedenih časovnih rokih za lastne potrebe (podatki so namenjeni v pomoč laboratoriju pri odkrivanju in preprečevanju predanalitskih napak, po možnosti v sodelovanju z oddelki zdravstvene ustanove) ali v okviru mednarodnega projekta IFCC, ki omogoča primerjavo vrste in pogostosti predanalitskih napak v različnih laboratorijsih (laboratorij se za sodelovanje odloči po lastni presoji, prijava je možna na spletni strani [www.ifcc-mqi.com](http://www.ifcc-mqi.com)). Podatke o kazalnikih kakovosti bi želela pridobiti tudi Delovna skupina za predanalitiko pri SZKKLM, predvsem podatke o vrsti in pogostosti posameznih predanalitskih napak, ki se pojavljajo v slovenskih laboratorijsih. Podatke bi želeli pridobiti enkrat letno za celoletno obdobje, ob ustreznem času bo delovna skupina pripravila obvestilo in poziv laboratorijem k sodelovanju.

# Zunanja ocena kakovosti za predanalitsko fazo

**Alenka France-Štiglic**

UKC Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Ljubljana, Slovenija

V zadnjih dveh desetletjih so bile objavljene številne študije s področja laboratorijskih napak v predanalitski, analitski in poanalitski fazi. Delež napak v analitski fazi se je v zadnjih desetletjih močno zmanjšal zaradi standardizacije analitskih tehnik, reagentov in instrumentov. Prav tako so k zmanjšanju števila napak pripomogle informacijske tehnologije in notranja kontrola kakovosti ter zunanje ocene kakovosti. Delež laboratorijskih napak v analitski fazi je glede na predanalitsko fazo majhen, saj se v predanalitski fazi zgodi kar 60–70 % napak (1, 2). Prav zato laboratoriji v zadnjih dveh desetletjih posvečajo vse več pozornosti preprečevanju predanalitskih napak, ki večinoma izvirajo iz priprave pacienta ter odvzema, transporta, priprave in shranjevanja vzorca. Standardizacija in spremeljanje predanalitskih spremenljivk sta zelo pomembna dejavnika pri učinkovitosti in dobri organizaciji laboratorija ter pri zmanjšanju možnega negativnega učinka predanalitskih napak na izid zdravljenja pacienta (3). Prvi korak za izboljšanje kakovosti predanalitske faze je zagotovo identifikacija možnih napak in ocenitev njihovega vpliva na varnost pacienta. Poleg uvedbe kazalnikov kakovosti v predanalitsko fazo in njihovega poenotenja, ki ga je pripravila Delovna skupina za laboratorijske napake in varnost pacientov pri IFCC, je zelo pomembno izobraževanje laboratorijskega osebja na področju predanalitskih napak (4). Nekatere sheme za zunano oceno kakovosti so uvedle tudi programe za oceno kakovosti predanalitske faze. Sheme za zunano oceno kakovosti so glede na metode za zunano oceno predanalitskih napak v glavnem razdeljene v tri različne skupine, in sicer na tiste, ki:

- pošiljajo vprašalnike s primeri iz prakse z možnimi posledicami napak v predanalitskih postopkih,
- pošiljajo prave vzorce z možnimi interferencami (npr.: hemolizirani, ikterični in lipemični vzorci ali serum namesto plazme) in
- zbirajo definirane in standardizirane tipe napak (kazalniki kakovosti), ki jih laboratorij zbira in poroča izvajalcu sheme za zunano kontrolo.

S prvo obliko sheme lahko zaobjamemo različne vidike predanalitske faze, hkrati pa vprašalniki oziroma primeri enostavno in hitro dosežejo veliko število laboratorijev. Laboratoriji dobijo povratne informacije v obliki poročila z analizo in pojasnilom rezultatov. Takšna oblika sheme ima poleg zunanje ocene kakovosti tudi izobraževalno vlogo (5).

V letu 2018 tudi Slovenska nacionalna shema za zunano oceno kakovosti (SNEQAS) poskusno uvaja program ocene kakovosti predanalitske faze. Program se bo izvajal v obliki vprašalnikov s primeri iz prakse, ki bodo vsebovali možne napake v predanalitskih postopkih in načine ravnanja laboratorijskega osebja, ko se s to napako sreča. Rezultati bodo vsebovali analizo odgovorov glede na pravilnost. Vsak primer bo imel pojasnilo napake, ki se je zgodila, in pojasnilo, kakšen bi bil najboljši možni ukrep v danem primeru. Shema bo imela predvsem izobraževalno vlogo. Če bo odziv dober, bo shema v prihodnosti razširjena tudi na primere napak v poanalitski in analitski fazi.

## LITERATURA

1. Lippi G, Guidi GC, Mtiuzzi C, Plebani M. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44:358-65.
2. Carraro P, Plebani M. Errors in a Stat Laboratory: Types and Frequencies 10 Years Later. *Clin Chem* 2007;53:1338-42.
3. Lippi G, Chance JJ, Church S, Dazzi P, Fontana R, Giavarina D, Grankvist Kjell et al. Preanalytical quality improvement: from dream to reality. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1113-26.
4. IFCC-Working Group on Laboratory Errors and Patient Safety. Quality Indicators in Laboratory Medicine; Model of Quality indicators, Quality Indicators – Key processes. IFCC WG-LEPS: MQI-KP- Revision 1 – January 2017.
5. Kristensen GBB, Moberg Aakre K, Kristoffersen AH, Sandberg S. How to conduct External Quality Assessment Schemes for the pre-analytical phase? *Biochimia Medica* 2014;24:114-22.

# Nova priporočila za odvzem venske krvi

**Nada Snoj**

UKC Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Ljubljana, Slovenija

## UVOD

Odvzem venske krvi (venepunkcija, flebotomija) je postopek, ki ga izvajamo z namenom **pridobitve krvnega vzorca** za laboratorijske preiskave. Odvzem venske krvi je **invaziven poseg** v človeško telo, ki ga lahko opravi le **strokovno usposobljena** oseba, ki ima za to potrebno **znanje in spretnost**. Ker je za laboratorijske analize primeren le **akovosten, biološko reprezentativen** vzorec, je postopek odvzema venske krvi **standardiziran**.

## PRIPOROČILA NA PODROČJU ODVZEMA VENSKE KRVI

Slovensko združenje za klinično kemijo (SZKK) je leta 1999 izdalo "Priporočeni postopek za odvzem venske krvi" (Majda Piskar), ki je bil usklajen s tedaj veljavnimi smernicami National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1998, H3-A4).

V letu 2010 so izšla zadnja priporočila WHO v zvezi z odvzemom krvi: "WHO Guidelines on Drawing Blood: Best Practices in Phlebotomy".

NCCLS, ki se je v letu 2004 preimenoval v Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), je od tedaj tretjič (2003, 2007, 2017) posodobil svoja priporočila v zvezi z odvzemom venske krvi. Zadnja so veljavna priporočila z naslovom CLSI "Collection of Diagnostic Venous Blood Specimens", 7th ed. (CLSI standard GP41), ki so izšla v aprilu 2017 in so po desetih letih nadomestila priporočila "Procedures for the Collection of Diagnostic Blood

Specimens by Venipuncture", Approved Standard-Sixth Edition (CLSI H3-A6) iz oktobra 2007. V letu 2013 je CLSI vsa priporočila na novo označil in preštevilčil, ta priporočila so dobila oznako GP41-A6.

Tik pred izidom je prva izdaja Evropskih priporočil za odvzem venske krvi (EFLM – COLABIOCLI Recommendation for venous blood sampling v 1.1), ki jih je pripravila delovna skupina za predanalizno fazo pri Evropski federaciji za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE) of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)) v sodelovanju z delovno skupino Latinske Amerike za predanalizno fazo pri konfederaciji Latinske Amerike za klinično biokemijo (Latin American Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE-LATAM) of the Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica (COLABIOCLI)).

Predlog priporočil je bil pripravljen v oktobru 2017 in poslan v javno obravnavo. Vsa nacionalna združenja so bila pozvana, da podajo pripombe na predlog do 10. decembra 2017. Pripombe je podalo 11 od 40 članic EFLM. Prav tako so predlog priporočil poslali v pregled WG-PRE-LATAM.

Končno verzijo evropskih priporočil z upoštevanimi pripombami so v maju 2018 poslali 40 članicam EFLM in 21 članicam COLABIOCLI, ki naj bi potrdila priporočila z zaključnim glasovanjem. IO SZKKLM naj bi potrdil priporočila na korespondenčni seji do 25. maja 2018. S končno potrditvijo naj bi ta dokument postal Uradna EFLM in COLABIOCLI priporočila za odvzem venske krvi.

Dokument zajema priporočila za odvzem venske krvi tako ležečih kot tudi zunanjih pacientov. Odvzem se pri enih in drugih nekoliko razlikuje, na primer pri pripravi pacienta

na odvzem, nameščanju pacienta in fizični aktivnosti pred odvzemom. Dokument ponuja smernice za zagotavljanje varnega odvzema krvi tako za pacienta kot tudi za osebo, ki jemlje. Priporočila so namenjena osebju, ki je neposredno vključeno v odvzem krvi. Omejena so izključno na zaprti način odvzema krvi in ne vključujejo smernic za odprt odvzem, odvzem z brizgo ali odvzem iz katetra. Prav tako se ne dotikajo soglasja bolnika, naročanja preiskav, rokovanja z vzorci in transporta, niti odvzema pri otrocih ali nezavestnih pacientih.

Priporočeni postopek temelji na najboljših razpoložljivih dokazih. Sleherni korak je ocenjen z uporabo sistema, ki točkuje kakovost dokaza in moč priporočila. Glavna poglavja teh priporočil so: 1. Postopki pred odvzemom, 2. Postopek odvzema, 3. Postopki po odvzemu in 4. Implementacija.

Namen evropskih priporočil je zagotoviti enostavna in zgoščena priporočila za odvzem venske krvi, z oceno tveganja in temelječ na dokazih. S tem dokumentom naj bi vzpodbudili in prispevali k začetku standardizacije na področju odvzema venske krvi na ravni Evrope in dodatno Latinske Amerike.

Študija, ki jo je WG-PRE EFLM objavila v letu 2013, je pokazala, da ima od 28 evropskih držav le sedem svoja lastna priporočila za odvzem venske krvi, sprejeta na nacionalni ravni. Poleg tega pa so tudi obstoječa nacionalna priporočila v marsičem pomanjkljiva, pri nekaterih korakih niso jasna in nedvoumna, ne upoštevajo nekaterih pomembnih podrobnosti. Glede na to, da niso vsi koraki enako pomembni z vidika varnosti, naj bi priporočila ponudila tudi do neke stopnje kritično oceno potencialnega tveganja, kadar priporočila niso upoštevana. Nenazadnje, marsikatera priporočila niso osnovana na dokazih ali pa kakovost dokazov ni bila ovrednotena.

Eden od pomembnih vidikov, ki jih obstoječa priporočila ne upoštevajo je, kako uspešno implementirati priporočene postopke v prakso. In prav to ponujajo pričujoča priporočila. Poleg celovitega pregleda najbolj kritičnih korakov standardiziranega postopka za odvzem venske krvi ponujajo tudi praktična navodila, kako uspešno premagati morebitne ovire in težave pri implementaciji priporočenih postopkov. Kljub temu pa je v evropskih priporočilih večkrat

poudarjeno, da so nacionalna pravila in priporočila v primeru, da se razlikujejo, nad tem dokumentom.

## METODOLOGIJA

V priporočilih, ki jih je pripravila EFLM WG-PRE in potrdila WG-PRE-LATAM, so izpostavili najbolj kritične predanalizne postopke, ki so vključeni v odvzem venske krvi in so, kjer je bilo mogoče, skladna s priporočili CLSI in WHO. Posamezni koraki v postopku so bili določeni oziroma dogovorjeni na osnovi najboljših dokazov in na podlagi poglobljene razprave med različnimi strokovnjaki iz 16 držav članic EFLM, ki so vključevali medicinske sestre, flebotomiste, specialiste laboratorijske medicine in predstavnike proizvajalcev potrošnega materiala za venski odvzem krvi.

Ko so bili posamezni koraki postopka odvzema venske krvi dogovorjeni, je bil vsak od njih ovrednoten na osnovi sistema, ki točkuje tako kakovost dokaza kot tudi moč priporočila. S pomočjo sistema točkovanja so postavili postopek, ki naj bi veljal za zlati standard, istočasno pa za korake z manjšo težo še vedno dopušča prilagoditve glede na lokalne zahteve. Ocena 1A pomeni najmočnejše priporočilo z najboljšimi dokazi, ocena 2C pa pomeni šibko oceno tako v moči priporočila kot tudi v podprtosti z dokazi.

### Ocena priporočila

- |    |  |
|----|--|
| 1A | Močno priporočilo, visoka kakovost dokazil |
| 1B | Močno priporočilo, zmerna kakovost dokazil |
| 1C | Močno priporočilo, nizka kakovost dokazil  |
| 2A | Šibko priporočilo, visoka kakovost dokazil |
| 2B | Šibko priporočilo, zmerna kakovost dokazil |
| 2C | Šibko priporočilo, nizka kakovost dokazil  |

**Tabela 1.** Šeststopenjska lestvica ocen za vrednotenje priporočil

Ocena priporočila	Jasnost tveganja / koristi	Kakovost dokazil	Posledice
1A Močno priporočilo, visoka kakovost dokazil	Koristi očitno prevladajojo nad tveganjem in obremenitvami ali obratno.	Dosledna dokazila iz dobro izvedenih randomiziranih, nadzorovanih testiranj ali prepričljivo dokazilo druge vrste. Ni verjetno, da bi nadaljnje raziskave spremenile naše zaupanje v oceno koristi in tveganja.	Močna priporočila, lahko se uporabljajo za večino bolnikov v večini primerov brez zadržkov. Zdravniki morajo upoštevati močna priporočila, razen če obstaja jasna in prepričljiva utemeljitev za alternativni pristop.
2C Šibko priporočilo, nizka kakovost dokazil	Negotovost pri ocenah koristi, tveganj in obremenitev; koristi so lahko skoraj uravnotežene s tveganji in obremenitvami.	Dokazila iz opazovalnih študij, nesistematičnih kliničnih izkušenj ali randomiziranih kontroliranih testiranj z resnimi pomanjkljivostmi. Vsaka ocena učinka je negotova.	Zelo šibko priporočilo; druge možnosti so lahko enako razumne.

Tabela 2. Ocene za vrednotenje priporočil, oblikovane glede na kakovost razpoložljivih dokazil, stopnja 1A in 2C.

Korak	Trdnost dokazov
1. Identificiramo pacienta	1C
2. Preverimo, ali je pacient tešč in ustrezno pripravljen na odvzem	1B
3. Pripravimo potrebne pripomočke za odvzem krvi	2C
4. Označimo/identificiramo epruvete	1C
5. Nadenemo rokavice	1C
6. Namestimo žilno prezezo	1A
7. Izberemo mesto vboda	1A
8. Razkužimo odvzemno mesto	1B
9. Vbodemo v veno	1A
10. Odvzamemo kri v prvo epruveto	1A
11. Sprostimo žilno prezezo	1A
12. Nežno obrnemo epruveto za en polni obrat	1B
13. Napolnimo preostale epruvete, upoštevaje priporočen vrstni red	1B
14. Izvlečemo iglo iz vene in aktiviramo varnostni mehanizem	1A
15. Zavržemo iglo skupaj z nastavkom	1A
16. Obvezemo vbodno mesto	1C
17. Pacientu naročimo, da nežno pritisca na odvzemno mesto ob iztegnjeni roki še 5 do 10 minut	1C
18. Premešamo vse epruvete še štirikrat	1B
19. Odstranimo rokavice	1A
20. Pacientu svetujemo, da počiva še 5 minut in se prepriča, da je krvavitev prenehala, preden odide	1A

Tabela 3. Odvzem venske krvi – vrstni red korakov

## IMPLEMENTACIJA SMERNIC

Za uspešno implementacijo je treba pripraviti dober in izvedljiv izvedbeni načrt. Prepoznati je treba potencialne zadržke, ovire in izzive, ki so mogoči na ravni:

- posameznika,
- javnega zavoda (bolnišnice, ZD, ...),
- nacionalni ravni.

Zadržek	Rešitev
Odpor posameznika do sprememb	Spremeniti pristop (predstaviti kot skupno vizijo in timsko delo)
Neznanje jezika	Priporočila v nacionalnem jeziku
Pomanjkanje znanja, ozaveščenosti in razumevanja glede nujnosti izvajanja priporočil	Izobraževanje, ozaveščanje, razumevanje potencialnega tveganja za pacienta in ranje

Tabela 4. Potencialni zadržki ob uvajanju smernic na ravni posameznika

Ovira, izliv	Rešitev
Finančni razlogi	Prikazati ceno slabe kakovosti
Pomanjkanje kadra, ki bi prevzel odgovornost za uvedbo sprememb	Imenovati „ambasadorja“ in ustanoviti delovno skupino, ki vključuje predstavnike laboratorijskih, zdravnikov, med. sester, oddelka za kakovost, oddelka za bolnišnične okužbe, za varstvo zaposlenih, vodstva
Uvedba novih smernic je nizko po prioriteti za vodstvo institucije	Predstaviti vodstvu koristi (prihranek, večja varnost pacientov, manj ponavljanj zaradi neustreznih vzorcev, prestiž, ...)

Tabela 5. Potencialne ovire ob uvajanju smernic na ravni institucije, javnega zavoda

Izziv	Rešitev
Pomanjkanje ozaveščenosti in razumevanja glede nujnosti uvedbe smernic	Imenovanje nacionalnega „ambasadorja“, ki prepozna in zbere zainteresirane strokovne skupine
Ni profesionalnega telesa, ki bi prevzelo odgovornost za uvedbo smernic	Ustanovitev delovne skupine za preanalitiko na nacionalni ravni
Več profesionalnih skupin je vključenih v izvajanje venskega odzema krvi	Multidisciplinarno sodelovanje vseh izvajalcev
Priporočila so podprtia le, če jih posreduje nacionalni regulativni organ	Vzpostaviti sodelovanje z nacionalnim regulativnim organom (zbornice, združenja, lahko tudi MZ) za podporo
Obstoječa nacionalna zakonodaja je v nasprotju s smernicami	Prilagoditi priporočila nacionalnim pravilom in predpisom
Smernice je težko uveljaviti, če niso uradno potrjene ali celo vključene v priznani regulativni dokument, kot npr. CLSI, ISO	EFLM se mora povezati z mednarodnimi regulativnimi telesi

Tabela 6. Potencialni izzivi ob uvajanju smernic na nacionalni ravni

Na ravni formalnega izobraževanja je nujno teoretično in praktično izobraževanje. V različnih evropskih državah so različni profili vključeni v odvzem krvi. Na ravni ustanove naj bi se izvajalo teoretično in praktično usposabljanje za odvzem krvi za vse novo zaposlene (priporočilo je najmanj en teden na odvzemu za zunanje paciente, najmanj 100 odvzemov pod nadzorom, opazovanje prvih pet in zadnjih pet odvzemov) s preverjanjem teoretičnega znanja in praktičnega znanja z opazovanjem izvedbe, za kar bi udeleženci prejeli certifikat. Vsaka zdravstvena institucija naj bi vzpostavila tudi sistem kontinuiranega izobraževanja, ki bi vključevalo preverjanje, obnovitveno usposabljanje in recertificiranje osebja. Najmanj enkrat letno naj bi potekalo preverjanje odvzema krvi z opazovanjem (najmanj tri osebe, 20 odvzemov) z uporabo standardiziranega

kontrolnega seznama (checklist). Najmanj na tri leta naj bi izvajali teoretično in praktično obnavljanje znanja (lahko e-learning), na vsakem oddelku naj bi bila ena odgovorna oseba za izobraževanje.

Kazalniki kakovosti so lahko učinkovito orodje za pridobivanje informacij v zvezi s tveganjem za napake, pogostostjo napak in njihovo porazdelitev skozi celoten analizni proces. Spremljamo lahko kakovost vzorcev, sprejetih v laboratorij, npr. premalo polnjene epruvete, koagulirani vzorci, hemolizirani vzorci, neskladje ID podatkov in podobno. S pomočjo kazalnikov kakovosti lahko zaznamo in izpostavimo različne nepravilnosti v postopku odvzema venske krvi in jih skušamo odpraviti.

## ZAKLJUČEK

Z upoštevanjem priporočil EFLM za odvzem venske krvi je mogoč pravilen odvzem, ki je varen tako za pacienta kot tudi za osebje, ki jemlje kri, ter je istočasno pogoj za pridobitev reprezentativnega vzorca, ki je primeren za analizo.

EFLM WG-PRE, ki je pripravila priporočila, se kot vodilno profesionalno telo na tem področju čuti prav tako odgovorno, da zagotovi izvedbeni načrt za uspešno uvedbo smernic v prakso na ravni Evrope.

Prizadeva si, da bi tudi Evropsko združenje za akreditacijo potrdilo smernice kot standard in spodbujalo njegovo uporabo na ravni vseh Evropskih držav.

Kot pomoč pri vpeljavi smernic naj bi EFLM WG-PRE pripravila celo vrsto orodij, ki bodo prosto dosegljiva na spletni strani [www.eflm.eu](http://www.eflm.eu) (ppt prezentacije za izobraževanje, video, test za preverjanje teoretičnih osnov, „checklist“ za periodično preverjanje praktične izvedbe, posterji, ...).

# Presoja predanalitskih dejavnikov v UKC Maribor

**Bernarda Jevšnikar**

UKC Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Maribor, Slovenija

V UKC Maribor zbiramo kazalnike kakovosti predanalitske faze od leta 2005. Rezultate mesečno pošiljamo v Center za kakovost ter Službo zdravstvene nege, letno pa o njih poročamo na kolegiju strokovnih vodij.

V oktobru 2017 smo na pobudo dobavitelja pripomočkov za odvzem krvi opravili presojo procesa odvzema krvi ter ravnanja z vzorci do analize v laboratoriju (1). Presoja je potekala na sedmih oddelkih in je zajela kirurgijo, internistiko, pedatrijo, infekcije, urgenco, Center za transfuzijsko medicino ter Oddelek za laboratorijsko diagnostiko. Pregledanih je bilo 70 odvzemov krvi in 549 vzorcev. Presojani so bili: shranjevanje pripomočkov za odvzem krvi, postopek identifikacije pacienta in označevanje vzorcev, proces obvladovanja preprečevanja okužb, tehnika odvzema krvi in varnost delavcev.

Presoja shranjevanja pripomočkov na oddelkih je pokazala, da oddelki uporabljajo pripomočke ustreznih rokov uporabe, na enem oddelku niso bili shranjeni na ustrejni temperaturi. Presoja identifikacije bolnika je pokazala, da v 11 % potrjevanje identitete ni bilo v skladu s priporočili. V 44 % niso bili ustrezeno označeni vzorci, na vzorcu sta bila zapisana le ime in priimek. Kljub temu smo v primerjavi z drugimi ustanovami na tem področju imeli v povprečju za 8 % boljši rezultat. Presoja procesa obvladovanja bolnišničnih okužb je pokazala, da v primerjavi z drugimi pri odvzemu krvi več uporabljamo rokavice za enkratno uporabo (77 % UKC MB, 64 %), enako pogosto prevezo za enkratno uporabo (7 % UKC MB, 7 %) in manj novo držalo (3 % UKC MB, 37 %). Slabši rezultat smo imeli v postopku razkuževanja vodenega mesta (56 % UKC MB, 68 %). Presoja tehnike odvzema krvi je pokazala, da v 42 % nepravilno popuščamo prevezo, v 74 % kri ni premešana po priporočilih, v 53 % je v napačnem zaporedju odvzeta citratna epruveta, v 20 % je v napačnem zaporedju odvzeta EDTA kri. Splošna uspešnost te faze je bila 30-odstotna, v primerjavi z ostalimi presojanimi bolnišnicami, ki imajo 50-odstotno uspešnost, je to kritična faza. Presoja področja varnosti zdravstvenih

delavcev je pokazala, da smo od primerjanih ustanov slabši v primerih načina uporabe varnih pripomočkov (v povprečju 7 %), da pa smo za 10 % boljši v splošni oceni uporabe varnih pripomočkov. Drugi del presoje se je nanašal na proces transporta in centrifugiranja vzorcev na oddelku za laboratorijsko diagnostiko in v centru za transfuzijsko medicino. Pregledano je bilo, ali so epruvete pravilno polnjene, število strdkov ter fibrina in število hemoliziranih vzorcev. Proses transporta je bil v primerjavi z drugimi ustanovami uspešnejši (77 % UKC MB, 50 %). Pomislek presojevalcev je veljal temperaturi transporta, ki ni nadzorovana. Čas transporta do analize je bil primerjalno krajiš (60 minut UKC MB, 83 minut). Centrifugiranje vzorcev se je popolnoma skladalo s priporočili (100 %). Pregled volumna napolnjenih epruvet je pokazal, da so te v velikem deležu neustrezno polnjene, da pa ne odstopamo od primerjanih ustanov (60 % UKC MB, 58 %). Manj je v naši ustanovi strdkov in fibrinov (96 % UKC MB, 88 %), kot zelo neustrezno so presojevalci ocenili število hemoliziranih vzorcev oziroma uspešnost na področju preprečevanja hemoliz (0 % UKC MB, 50 %) (2).

Presoja je pokazala, da je splošna uspešnost v naši bolnišnici 67-odstotna in je primerljiva z drugimi bolnišnicami (65 %). Presojevalci so na osnovi presoje podali priporočila, ki se nanašajo na teoretično in praktično usposabljanje delavcev, prenovo navodil in standardnih operativnih postopkov ter uporabo tehnološko naprednejših pripomočkov in epruvet.

## LITERATURA

1. BD Life Sciences Preanalytical Systems, BD Laboratory Consulting Services™. Preanalytical Quality Check (PAQC), BD-QC-17-315-Maribor\_SS\_RS\_engl. 2017
2. Clinical Laboratory Standards Institute. CLSI H3 A5 Ed. 5, Procedures For The Collection Of Diagnostic Blood Specimens By Venipuncture. CLSI; 2005

# Klinični primeri predanalitskih napak

**Greta Štraki**

Splošna bolnišnica Murska Sobota, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Murska Sobota, Slovenija

Laboratorijska medicina ima pomembno vlogo pri združveni obravnavi pacientov. Kar sedemdeset odstotkov zdravniških odločitev temelji na laboratorijskih izvidih. Zdravniki na osnovi rezultatov laboratorijskih preiskav postavijo diagnozo, ocenijo in spremajo pacientovo združveno stanje in se odločijo za vrsto zdravljenja. Na rezultate laboratorijskih preiskav vplivajo različni dejavniki. Negativna posledica njihovih vplivov je laboratorijska napaka, do katere lahko pride v katerem koli delu laboratorijskega procesa.

Celokupni proces laboratorijskega testiranja je razdeljen v predanalitsko, analitsko in po-analitsko fazo. V zadnjem času pa nekateri avtorji opisujejo tudi pred-predanalitsko in po-poanalitsko fazo, ki potekata izven laboratorija in nista pod neposrednim nadzorom laboratorijskega osebja. Največ napak se zgodi v predanalitski fazi. Te so večinoma posledica človeške napake, bodisi zaradi pomanjkanja navodil oziroma standardov ali pa navodila in standardi niso upoštevani. Predanalitsko fazo predstavljajo vsi procesi in postopki, ki se zgodijo pred laboratorijsko analizo vzorca. Prične se z izbiro ustrezne laboratorijske preiskeve, naročilom preiskave in se nadaljuje s pripravo pacienta na odvzem, odvzemom biološkega materiala, pravilnim transportom vzorca do laboratorija ter ustrezno pripravo odvzetega materiala na analizo. Poteka tako v laboratoriju kot tudi izven njega, zato je vanjo poleg laboratorijskega vključeno tudi ostalo medicinsko osebje, ki pomembno vpliva na kakovost laboratorijskih preiskav.

Z namenom harmonizacije in poenotenja postopkov predanalitske faze na evropskem področju je EFLM leta 2012 ustanovil delovno skupino za predanalitiko WG-PRE, katere cilj je spodbujanje pomena kakovosti predanalitske faze laboratorijskega procesa in opredelitev najboljših praks za nekatere kritične dejavnosti v predanalitski fazi. Skupaj z Becton Dickinsonom so organizirali že štiri konference o predanalitiki. Delovna skupina za predanalitiko pri SZKKLM je po vzoru WG-PRE pričela z zbiranjem

praktičnih primerov predanalitskih napak. V nadaljevanju je predstavljenih nekaj od številnih zanimivih primerov iz vsakdanje prakse, ki so lahko v pomoč pri nadalnjem delu.

**Primer 1:** Profesor W. G. Guder je v šestdesetih letih deloval kot svetovalec na kliniki z 2000 posteljami. V tistem času so na kliniki zamenjali steklene epruvete za večkratno uporabo z novimi steklenimi epruvetami za enkratno uporabo. Epruvete niso imele zamaškov. Nekega deževnega dne so opazili, da je večina vzorcev z enega oddelka hemoliziranih. Ta oddelek je bil oddaljen od laboratorija približno 1 km, polovica poti pa je potekala na prostem. Ker podobnega pojava niso opazili pri vzorcih z drugih oddelkov, so menili, da nove epruvete niso vzrok za hemolizo. Pojav hemolize je bil še bolj izražen pozimi. Po daljšem času spremljana in iskanja vzrokov za hemolizo so ugotovili, da so dežne kaplje povzročile razredčenje krvi, kar je povzročilo njeni hipoosmolalnost in hemolizo vzorca.

**Primer 2:** 34-letna pacientka je prišla na pregled v ginekološko ambulanto po več spontanih splavih. Od zadnjega spontanega splava je minilo približno 14 dni. Ginekologinja je naročila teste za trombofilijo. V laboratoriju so ugotovili znižano koncentracijo proteina S (prosti antigen), vrednost je bila 57 % (ref. vrednosti: Ž > 60 %, M > 68 %), ostali testi so bili v referenčnem območju. Priporočili so ponovitev preiskave proteina S, ko bo hemostaza uravno-vešena. Ob ponovnem odvzemu je bil rezultat proteina S znotraj referenčnega območja, torej gospa nima trombofilije. V tem primeru je bil naročen neustrezen test, oziroma ni bilo upoštevano, da so v nosečnosti vrednosti proteina S prehodno znižane.

**Primer 3:** 50-letni pacient je bil sprejet v urgentni center zaradi domnevne akutnega miokardnega infarkta. Opravljena je bila interventna koronarografija. Ob koncu posega je bil odvzet vzorec krvi iz femoralne arterije v epruveto z Li-heparinom in gelom (Vacutainer® SST™; BD) za določitev troponina. Po centrifugirjanju so ugotovi-

li neobičajen položaj gela, ki je plaval na vrhu krvnih celic, plazma je bila na dnu epruvete. V laboratoriju so vzorec zavrnili in zahtevali ponoven odvzem.

Vzrok za nenormalni položaj gela je bila prisotnost tri-jodirane neionske vodne raztopine rentgenskega kontrastnega barvila Iomeron 400, apliciranega pred koronarno revaskularizacijo, ki lahko poveča gostoto plazme ali serumu v takem obsegu, da presega gostoto separacijskega gela, kar ovira pravilno oblikovanje pregrade med celicami in plazmo. Zaradi ostanka kontrastnega sredstva so laboratorijski rezultati lahko lažno nizki zaradi redčenja s kontrastnimi sredstvi ali pa so napačni zaradi interferenc s samimi testi. Temu pojavu se lahko izognemo z ustreznim izpiranjem venskih ali arterijskih katetrov pred odvzemom vzorcev, oziroma počakamo z odvzemom toliko časa, da mine vsaj ena razpolovna doba eliminacije kontrastnega sredstva. Ker je razpolovni čas izločanja teh spojin značilno nižji od dveh ur, je pri bolnikih, ki so za diagnostične namene dobili kontrastna sredstva, priporočen odvzem krvi za laboratorijske preiskave po tem času.

**Primer 4:** 62-letna pacientka z diabetesom, esencialno trombocitemijo in kronično jetrno bolezni jo je bila hospitalizirana zaradi ulkusa s hemoragičnim šokom. Zaradi operacije so ji začasno ukinili zdravila za zdravljenje esencialne trombocitemije (hydroxylcarbamide 500 mg/dan). Po operaciji so dnevno kontrolirali krvno sliko, elektrolite, delovanje ledvic in opravili še ostale biokemične laboratorijske teste.

Dvanajsti dan po operaciji so laboratorijski testi pokazali serumsko hiperkaliemijo  $6,3 \text{ mmol/L}$ , levkocitozo  $39,8 \times 10^9/\text{L}$  in trombocitozo  $1392 \times 10^9/\text{L}$ . Po operaciji so ugotovili postopno povečanje koncentracije kalija v serumu in števila trombocitov. Število trombocitov se je povečalo z  $245$  na  $1392 \times 10^9/\text{L}$ . Koncentracija kalija v serumu se je povečala s  $4,7$  na  $6,4 \text{ mmol/L}$ . Ugotovili so korelacijo med koncentracijo kalija v serumu in številom trombocitov. V laboratoriju so preverili vzorec in ugotovili, da ni bil hemoliziran, ponovili so meritev kalija v istem vzorcu in dobili enak rezultat. Ker ostali laboratorijski testi niso kazali na ledvično odpoved, so pomisli na psevdohiperkaliemijo in podali rezultat s komentarjem: sum na psevdohiperkaliemijo zaradi trombocitoze in levkocitoze, priporočamo ponovni odvzem vzorca z Li-heparinom ali meritev kalija v polni krvi v elektrolitsko uravnoteženi litijevi heparinski brizgi. To so sporočili tudi na oddelk in klic zabeležili v informacijskem sistemu. Rezultata za kalij iz vzorca Li-heparin plazme  $4,6 \text{ mmol/L}$  in

iz polne krvi na aparatu za plinsko analizo krvi  $3,4 \text{ mmol/L}$  sta potrdila psevdohiperkaliemijo. Iz tega lahko sklepamo, da centrifugiranje lahko povzroči razpad celic in s tem povečane vrednosti kalija v vzorcu, prav tako se kalij sprošča iz trombocitov med procesom strjevanja krvi.

V nekaterih primerih lahko problem v predanalitski fazi prepoznamo pri interpretaciji rezultatov. Na psevdohiperkaliemijo moramo pomisliti pri vsakem povišanju krvnih trombocitov ali levkocitov v krvni sliki, ki sovpada z nepojasnjeno serumsko hiperkaliemijo običajno pri bolniku, ki nima ledvične odpovedi ali acidoze, ali ki ne jemlje zdravil, kot so zaviralci angiotenzinske konvertaze in srčni glikozidi.

**Primer 5:** 79-letna pacientka je bila pred pregledom v diabetološki ambulanti napotena v laboratorij na preiskave albumina in kreatinina v urinu. Vzorec urina, ki ga je pacientka oddala v laboratorijski čaši, je vseboval majhne rjave granule, podobne silikagelu. V laboratoriju niso mogli ugotoviti, v kakšni embalaži je pacientka prinesla vzorec, zato so jo poklicali na ponovni odvzem urina. Med tem so pregledali različne vrste silikagela; silikagel iz vzorca se je ujemal s silikagelom v embalaži za testne lističe Combur.

Silikagel je amorfna oblika  $\text{SiO}_{2}$  sredstva ki se uporablja za vpijanje vode in vlage. V laboratoriju so testirali vpliv različnih silikagelov na meritev biokemijskih urinskih preiskav in ugotovili, da so ob prisotnosti silikagela iz pokrova Combur test bistveno povišane (Na, K, Cl, Mg, proteini, albumin) ali znižane (Ca, P, kreatinin) vrednosti analitov. Izjemi sta bili vrednosti glukoze in sečnine, ki sta ostali nespremenjeni.

Prisotnost silikagela v urinskem vzorcu predstavlja predanalitsko napako, saj lahko silikagel, glede na njegovo obliko in količino ter volumen vzorca, vpliva na izmerjene koncentracije analitov zaradi vezave analita s silikagelom ali zaradi spremenjene koncentracije po vezavi vodnega matriksa vzorca s silikagelom.

**Primer 6:** V prehospitalni enoti (deluje pod okriljem ZD Maribor v UKC Maribor) je iskala pomoč pacientka Jožica X (ime je izmišljeno). Pri obravnavi je bila odvzeta kri za laboratorijske preiskave; vzorci so bili pravilno označeni, usklajeni z napotnico in poslanici v laboratorij. V laboratoriju so napotnico skenirali in s tem prenesli podatke o pacientki in naročilu preiskav iz Medisa (HIS) v Labis (LIS). Vse naročene preiskave so bile opravljene in rezultati so bili poslanici po

računalniški mreži do prehospitalne enote. Kasneje je laboratorij prejel donaročilo preiskav za pacientko Jožico Y, ki je bila obravnavana v enoti INP, ki deluje kot bolnišnična ambulanta. Pacientka naj bi bila predhodno obravnavana v prehospitalni enoti. V laboratoriju so napotnico skenirali, povzeli in prenesli podatke o pacientki ponovno iz Medisa (HIS) v Labisu (LIS). V Labisu so poiskali predhodno naročilo in številko vzorca. Vendar vzorec ni imel pravilne identitete. Vzorec je imel ime Jožica X, v Labisu pa podatkov o Jožici X ni bilo.

Po telefonskem pogovoru med laboratorijem, prehospitalno enoto in INP je bilo ugotovljeno, da sta Jožica X in Jožica Y ista oseba, in da je X dekliški priimek Jožice Y, ki je bila obravnavana v prehospitalni enoti in premeščena v INP, kjer so podatke prebrali z zdravstvene izkaznice preko številke kartice zdravstvenega zavarovanja (KZZ), ki je 9-mestna številka in je edinstvena za vsako osebo. Laboratorij ni mogel pridobiti informacije, na kakšen način je prišlo v prehospitalni enoti do obravnave pacientke z dekliškim priimkom in ali je bila obravnavana opravljena z zdravstveno kartico ali brez.

Ob prvi obravnavi pacientke so bili iz Medisa v Labis povzeti podatki o Jožici X, ob drugi obravnavi pa podatki z novo identitetom Jožica Y. Sistem je prepoznal, da gre za isto osebo, zato je samodejno korigiral vse prejšnje podatke o pacientki v Labisu. Tako so bili po drugi obravnavi v Labisu samo podatki o Jožici Y, Jožica X pa ni več obstajala.

Ker v laboratoriju ne uporabljamo pacientovih KZZ in tudi nimamo nobenega drugega načina, kako preverjati skladnost identifikacije pacientov, je FINPRO kot upravitelj Labisa pripravil novo verzijo programa, v kateri se po novem prikaže obvestilo ob vsaki spremembi identifikacije pacienta.

Ali je primerno opravljati laboratorijske preiskave iz vzorca z drugo identifikacijo? Ali lahko iz vzorca s prvotno identifikacijo JOŽICA X opravimo dodatne preiskave za osebo z novo identifikacijo JOŽICA Y? V laboratoriju tega niso naredili, za omenjeno pacientko je bil zahtevan ponoven odvzem krv. Če pa LIS omogoča istovetenje oseb z različno identifikacijo, to lahko opravimo.

**Primer 7:** Po požaru v kemični tovarni Kemis so v Laboratoriji za analitiko encimov in elementov v sledovih v KIKKB prejeli vzorce na analizo elementov v sledovih za 300 gasilcev iz različnih krajev Slovenije. Pri 20 vzorcih so ugotovili vrednost za barij med 20 in 30 µg/L (orientacijska vrednost

do 1µg/L). Pri iskanju vzroka povišanih vrednosti so ugotovili, da gre za vzorce gasilcev iz Ptuja, ki so bili odvzeti v epruvete s serijsko številko, ki je v laboratoriju niso preverili glede vsebnosti elementov v sledovih. Po opravljeni analizi praznih epruvet so ugotovili, da prazne epruvete te serije vsebujejo 20 do 30 µg/L barija. Proizvajalec epruvet za elemente v sledovih navaja v specifikacijah vrednosti posameznih elementov v praznih epruvetah samo za 12 elementov. Za ostale je za kakovosten rezultat treba vsebnost posameznega elementa preveriti v laboratoriju za vsako serijo v vsaj petih epruvetah. Da bi se izognili morebitnim podobnim napakam, v Laboratoriju za analitiko encimov in elementov v sledovih pozivajo, da se pred odvzemom vzorcev posvetujete z njimi glede ustreznosti serije uporabljenih epruvet (telefon 01/522 24 10 ali 01/522 27 42).

Vseh predanalitskih napak v laboratoriju ne moremo odkriti. S poznanjem možnih vzrokov zanje pa lahko preprečimo izdajanje nepravilnih rezultatov, saj predanalitska faza pomembno vpliva na zanesljivost laboratorijskih rezultatov in s tem tudi na varnost bolnikov. Delovna skupina za predanalitiko pri SZKKLM je podala predlog, da bi na spletni strani združenja objavljali primere predanalitskih napak. Zato je pri objavi primerov iz vsakdanje prakse zaželeno sodelovanje vseh laboratorijev. Na ta način bi s svojimi primeri lahko pomembno prispevali k širši prepoznavi, razumevanju in reševanju različnih predanalitskih problemov ter izobraževanju laboratorijskih strokovnjakov.

## LITERATURA

1. Lippi G, Becan-McBride K, Behúlová D, Bowen RA, Church S, Delanghe J, et al. Preanalytical quality improvement: in quality we trust. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51:229-41.
2. Lippi G, Banfi G, Church S, Cornes M, De Carli G, Grankvist K, et al. Preanalytical quality improvement. In pursuit of harmony, on behalf of European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working group for Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin Chem Lab Med*. 2015;53:357-70.
3. Guder WG. History of the preanalytical phase: a personal view. *Biochem Med*. 2014;24(1):25-30.
4. Lippi G., Daves M., Mattiuzzi C. Interference of medical contrast media on laboratory testing. *Biochem Med*. 2014;24(1):80-88.
5. Simundic AM, Lippi G. Preanalytical Phase—a Continuous Challenge for Laboratory Professionals. *Biochem Med*. 2012;22(2):145-9.
6. Salek T. Pseudohyperkalemia - Potassium released from cells due to clotting and centrifugation - a case report. *Biochem Med*. 2018;28(1):01102.



# 03 | Porfirije

# Diagnosing Porphyria

**Sverre Sandberg**

The Norwegian Porphyria Centre (NAPOS), Haukeland University Hospital; NO-5021 Bergen,  
Norway. sverre.sandberg@uib.no

To be able to diagnose porphyrias in an effective way, it is essential to establish standardized routines for how this can be done. In practice, a porphyria specialist centre should be able to

- give advice on what samples to send for porphyria diagnosing and monitoring,
- select the correct constituents for analysis given the clinical history,
- perform the analyses with high analytical quality
- diagnose the different types of porphyria
- give expert comments on the results
- give advice on the further follow up and monitoring of the patient

The European Porphyria Network (EPNET) is working towards making the laboratories participating in EPNET be able to fulfill the goals stated above.

The present lecture will give an overview on how to diagnose the different types of porphyria and also initiate a discussion on how this can be done in practice.

# Porphyrias in Norway

**Mira Mykletun, Aasne Karine Aarsand, Egil Støle, Jørild Haugen Villanger,  
Mette Christophersen Tollånes, Carl Baravelli, Sverre Sandberg**

The Norwegian Porphyria Centre (NAPOS) Laboratory for Clinical Biochemistry Haukeland University Hospital

**BACKGROUND** Porphyria is an umbrella term for a group of largely hereditary diseases that are due to defective haem synthesis. The diseases have a varied and partly overlapping range of symptoms and presentations. The commonest forms of porphyria are porphyria cutanea tarda, acute intermittent porphyria and erythropoietic protoporphyrina. The purpose of this study was to provide an overview of the prevalence and pathological manifestations of porphyrias in Norway.

**MATERIAL AND METHOD** Information on all patients registered with the Norwegian Porphyria Centre (NAPOS) up to 2012 was used to estimate the prevalence and incidence of porphyrias in Norway. Figures on symptoms, precipitating factors and follow-up routines were obtained from the Norwegian Porphyria Registry, which includes 70 % of Norwegians registered with NAPOS as having porphyria.

**RESULTS** The prevalence of porphyria cutanea tarda was approximately 10 : 100 000 and that of acute intermittent porphyria approximately 4 : 100 000. The total incidence of all porphyrias was approximately 0.5 – 1 : 100 000 per year. Diagnostic delay, i.e. the time passing between the onset of symptoms and diagnosis, varied from 1 – 17 years depending on the type of porphyria. There was wide variation in the frequency with which patients with the various types of porphyria went for medical check-ups.

**INTERPRETATION** The prevalence of acute intermittent porphyria and porphyria cutanea tarda appears to be higher in Norway than in most other countries. Data from the Norwegian Porphyria Registry make it possible to demonstrate differences in treatment and follow-up of porphyria patients and may be used to initiate necessary measures.

## MAIN POINTS

**Porphyrias are rare; about 40 – 60 new cases are diagnosed in Norway each year. The time from symptom onset to diagnosis varies from one to 17 years, depending on the type of porphyria. The Norwegian**

**Porphyria Registry makes it possible to monitor trends in the diagnosis, management and treatment of this patient group.**

Porphyria is an umbrella term for a group of rare, largely hereditary diseases that are due to abnormal activity in the various enzymes involved in haem synthesis (1). The diagnosis in symptomatic patients is based on identification of characteristic haem precursor patterns in urine, faeces and blood. However, the symptoms and biochemical findings associated with some of the diseases overlap, which makes correct diagnosis challenging.

Some of the porphyrias present with potentially life-threatening, acute attacks characterised by severe abdominal pain and neurological and mental symptoms, while others with cutaneous symptoms in the form of vesicles and fragile skin or acute painful photosensitivity (Table 1). Two of the diseases can cause both acute attacks and cutaneous symptoms. Most porphyrias have low clinical penetrance (2). The two most commonly occurring porphyrias, porphyria cutanea tarda and acute intermittent porphyria, are inherited in an autosomal dominant fashion. Porphyria cutanea tarda also occurs as a sporadic, non-hereditary form (3).

Healthcare professionals' knowledge and experience of rare diagnoses like porphyrias will often be limited. Acute porphyrias in particular are differential diagnoses of other, far more frequently occurring diagnoses, such as appendicitis and various neurological diseases. Patients may therefore experience a long work-up before they are correctly diagnosed. Early, correct diagnosis is particularly important in acute porphyrias, because guidance on safe and unsafe drugs and lifestyle can help to avert acute attacks both in those who have suffered attacks previously and in genetically predisposed individuals who have not developed symptoms (4 – 6).

The subject of acute porphyrias has been addressed previously in Tidsskriftet (7, 8), but as with many other rare dis-

eases, there are few systematic studies based on large cohorts. The aim of this study was to use information about people with porphyrias registered with the Norwegian Porphyria Centre (NAPOS) and data from the Norwegian Porphy-

ia Registry to provide an overview of porphyrias in Norway, focusing on incidence, prevalence, time from onset of symptoms to diagnosis, follow-up routines and quality of life.

## MATERIAL AND METHOD

NAPOS has the overall responsibility for diagnosing porphyrias, and diagnoses almost all cases in Norway. When the centre was established in 1999, other laboratories that performed porphyria diagnostics were contacted, and information was obtained about patients who had been diagnosed at these laboratories.

Data such as gender, age, place of residence and diagnosis for all people registered with NAPOS up to 2012 were used to

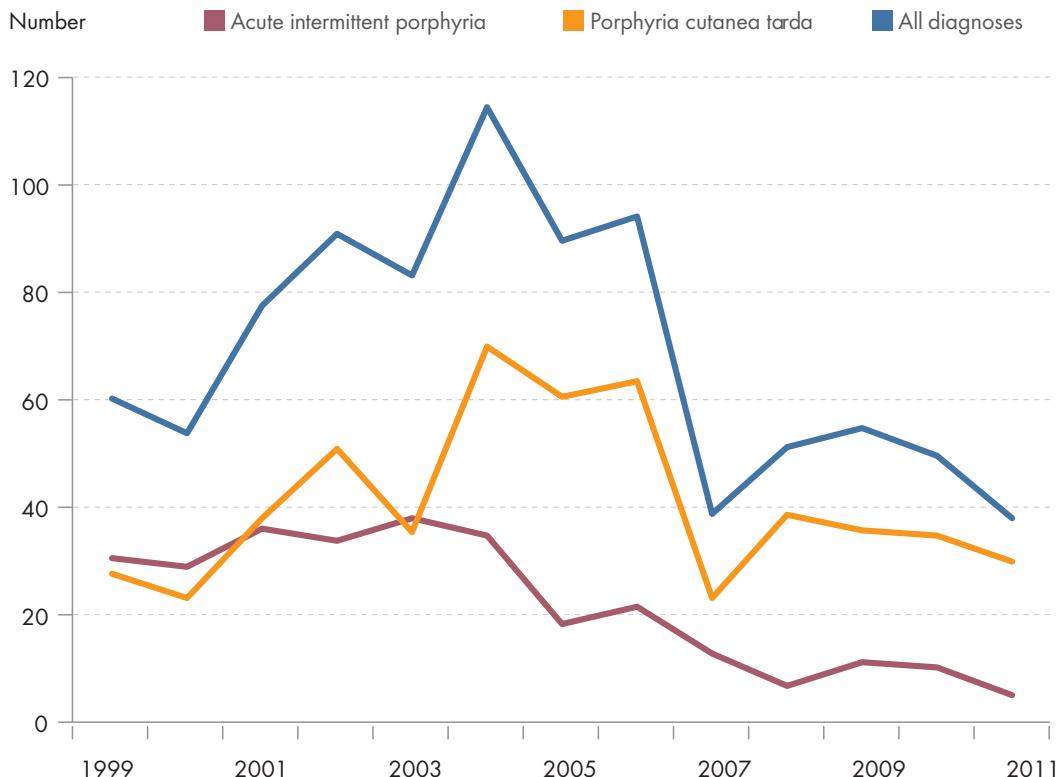
estimate the prevalence and incidence of the different porphyrias. The diagnoses were established on the basis of diagnostic algorithms as described by Badminton et al. (4). Porphyria-related biochemical analyses were performed at the Laboratory of Clinical Biochemistry, Haukeland University Hospital, and DNA analyses were performed at the hospital's Centre for Medical Genetics and Molecular Medicine.

**Table 1** Overview of symptoms, inheritance and prevalence of porphyrias with 10 or more registered cases at the Norwegian Porphyria Centre (NAPOS) up to 2012

Diagnosis	Symptoms	Inheritance	Number of persons
<b>Acute porphyrias</b>			
Acute intermittent porphyria	Acute attacks	Autosomal dominant	326
Symptomatic <sup>1</sup>			189
Predictively identified <sup>2</sup>			137
Hereditary coproporphyria	Acute attacks and/or photosensitivity in the form of skin fragility and blisters	Autosomal dominant	10
Variegate porphyria	Acute attacks and/or photosensitivity in the form of fragile skin and blisters	Autosomal dominant	30
<b>Cutaneous porphyrias</b>			
Porphyria cutanea tarda	Photosensitivity in the form of fragile skin and blisters	Autosomal dominant/sporadic	576
Symptomatic <sup>1</sup>			509
Predictively identified <sup>2</sup>			67
Erythropoietic protoporphyrina	Acute painful photosensitivity	Autosomal recessive	32
<b>Total</b>			<b>974</b>

<sup>1</sup> Has or has had symptoms of his/her porphyria

<sup>2</sup> Never-symptomatic patients identified as being genetically predisposed for porphyrias



**Figure 2** Number of new diagnoses per year at the Norwegian Porphyria Centre (NAPOS) in the period 1999 – 2011 (n = 896). "All diagnoses" covers acute intermittent porphyria, porphyria cutanea tarda, variegate porphyria, hereditary coproporphyria and erythropoietic protoporphyrina

A distinction is made in the article between symptomatic and predictively identified porphyrias. The term "symptomatic" is used when a person has or has had symptoms of porphyria. "Predictively identified" is used when a person has been found to be genetically predisposed to porphyria, but without having had symptoms.

Information about the last place of residence registered (as of November 2011) was obtained from the Norwegian National Population Registry and population figures (as of October 2011) from Statistics Norway. Deceased subjects are not included in the prevalence figures quoted.

The Norwegian Porphyria Registry is a high quality national medical registry based on the systematic collection of questionnaires completed by patients. All patients registered with NAPOS with the diagnoses porphyria cutanea tarda, acute intermittent porphyria, variegate porphyria, hereditary coproporphyria, erythropoietic protoporphyrina and predic-

tively identified acute porphyrias are invited to participate.

When the registry was established in 2002, a questionnaire was sent to everyone with these diagnoses. Since then, the invitation and questionnaire have been sent out in connection with initial contact through the treating doctor or the genetic counsellor. Participants receive a follow-up form one or two years after the first questionnaire, and thereafter every four years.

A total of 680 persons (70 % of those invited), 370 women and 310 men, were registered in the Norwegian Porphyria Registry as of February 2012. Information about symptoms, precipitating factors and incorrect treatment were obtained from the first questionnaire. Data on monitoring and follow-up routines and quality of life were based on the most recently submitted questionnaire. Most questions had multiple choice responses with the option of free text. Information on quality of life was extracted from a single non-standardised question in the questionnaires (Fig. 1). Differences

in monitoring and follow-up routines for participants who had had porphyria cutanea tarda or acute intermittent porphyria for four years or more ( $n = 370$ ) were investigated.

Descriptive analyses and simple statistical tests were conducted using SPSS Version 18.0. The chi-squared test was used to determine whether there were significant differences between the genders with respect to symptoms and pre-

cipitating factors. P-values of less than 0.05 were regarded as statistically significant. PX-Map (2009, Statistics Norway, Oslo) was used to create a prevalence map.

The Norwegian Porphyria Registry has authorisation from the Norwegian Data Protection Authority, and the study was approved by the Regional Committee for Medical and Health Research Ethics (Rek Vest).

## RESULTS

### Incidence and prevalence

In the period 2000 – 2004, the number of porphyria diagnoses rose from year to year (Fig. 2). In particular, the number of porphyria cutanea tarda and predictively identified acute intermittent porphyria cases increased compared with previous years. From 2003 to 2006 there was also a pronounced increase in the number of predictively identified porphyria cutanea tarda cases (not shown). In the period 1999 – 2011, the rarer diseases, hereditary coproporphyria and variegate porphyria, were diagnosed more frequently than before. For the past five years, the total number of new cases of porphyria has stabilised at an annual incidence of about 0.5 – 1 : 100 000.

Porphyria cutanea tarda is the most prevalent porphyria in Norway, with a total of 576 registered cases (Table 1), 12 % of which were predictively identified without the patient having symptoms. Corresponding statistics for acute intermittent porphyria are 326 and 42 %.

Prevalence was calculated at about 10 : 100 000 for symptomatic porphyria cutanea tarda and 4 : 100 000 for symptomatic acute intermittent porphyria. If cases with predictively identified genetic predisposition were included, the overall prevalence was about 12 : 100 000 for porphyria cutanea tarda and about 7 : 100 000 for acute intermittent porphyria.

Statistics for the overall prevalence of these two porphyrias distributed by county revealed large geographical differences (Fig. 3). Of genetically tested porphyria cutanea tarda cases ( $n = 458$ ), 182 had the sporadic form and 276 the hereditary form of the disease.

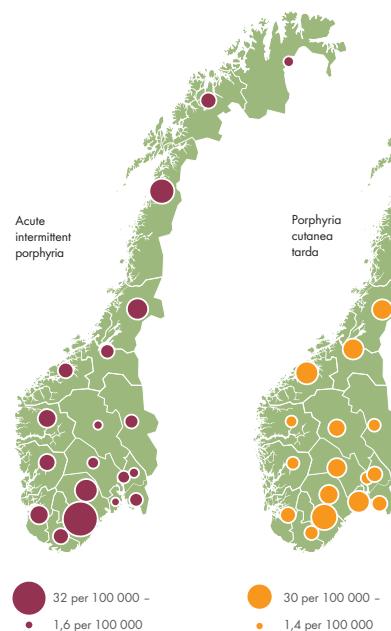
### Diagnostic delay

The median age of symptom onset was 54 for porphyria cutanea tarda, 23 for acute intermittent porphyria and two years for erythropoietic protoporphyrina. The median diagnostic delay was one year for porphyria cutanea tarda, four years for acute intermittent porphyria and 17 years for erythropoietic protoporphyrina.

A total of 89 % of the subjects with porphyria cutanea tarda and 54 % of those with acute intermittent porphyria were diagnosed within 5 years of the onset of symptoms (Fig. 4). 13 % of the subjects with acute intermittent porphyria and 36 % of those with erythropoietic protoporphyrina reported a diagnostic delay of more than 20 years. Subjects with erythropoietic protoporphyrina in particular (54 %), but also subjects with acute intermittent porphyria (37 %) reported what they themselves believed was incorrect treatment before the diagnosis was made. A smaller percentage of the group with porphyria cutanea tarda reported incorrect treatment (20 %).

### Symptoms and precipitating factors

Among the subjects with acute intermittent porphyria, mental stress (63 %) and physical stress (50 %) were the factors reported by most subjects as precipitating attacks. Next came medicines (40 %), lack of sleep (37 %), alcohol (31 %), working environment (27 %), hunger (27 %), other illnesses (25 %) and food (22 %). A larger proportion of women than men reported that physical stress ( $p = 0.029$ ) or mental stress ( $p = 0.042$ ) had been a precipitating factor. Menstruation and the use of contraceptive pills were cited as precipitating factors by 22 % and 18 %, respectively, of the women.



**Figure 3** Prevalence by county, per 100 000 inhabitants, of acute intermittent porphyria ( $n = 323$ ) and porphyria cutanea tarda ( $n = 570$ ) registered at the Norwegian Porphyria Centre (NAPOS) as of 31.12. 2011, including never symptomatic patients identified as being genetically predisposed for porphyrias

**Table 2** Symptoms of acute intermittent porphyria, porphyria cutanea tarda and erythropoietic protoporphyrina reported to the Norwegian Porphyria Registry

Acute intermittent porphyria (n = 134)		Porphyria cutanea tarda (n = 379)		Erythropoietic protoporphyrina (n = 28)	
Symptoms experienced in acute attacks	Per cent	Photosensitivity in the form of fragile skin and blisters	Per cent	Acute painful photosensitivity	Per cent
Severe abdominal pain	93	Blisters	96	Burning/stinging pain	96
Fatigue	72	Fragile skin	86	Red/swollen skin	86
Dark/reddish urine	64	Dark/reddish urine	55	Sores/crusting	50
Muscular pain	63	Abnormal hair growth	33	Blisters	32
Muscular weakness	59	Increased pigmentation	30		
Palpitations	53				
Headache	52				
Vomiting	47				
Obstipation	46				
Mental symptoms	40				
Impaired sensation	39				
Paralysis	26				

In about 20 % of the patients with porphyria cutanea tarda, alcohol was reported as a susceptibility factor. In about 10 %, liver disease or iron supplement was a susceptibility factor, while 40 % of the women reported that the disease was triggered by oestrogens.

The prevalence of symptoms reported to the Norwegian Porphyria Registry for the three most commonly occurring porphyrias is given in Table 2. No significant differences were found between genders.

### **Outpatient monitoring and follow-up**

The frequency of medical check-ups varied substantially for subjects with the different porphyria diagnoses. Ninety-four

percent of subjects with predictively identified acute intermittent porphyria, 56 % of those with symptomatic acute intermittent porphyria and 33 % of those with porphyria cutanea tarda never went for medical check-ups. 42 % per cent of acute intermittent porphyria patients and 58 % of porphyria cutanea tarda patients went for one or more check-ups per year.

### **Quality of life**

About half the participants with symptomatic acute intermittent porphyria and porphyria cutanea tarda reported a reduced quality of life (Fig. 1). The proportion for erythropoietic protoporphyrina was somewhat higher.

## **DISCUSSION**

After the establishment of NAPOS in 1999, the number of persons diagnosed with porphyrias in Norway increased from about 10 – 20 per year before 1999 to a maximum of 110 in 2004. The pre-1999 figures are uncertain, as they are based on information from different hospitals in Norway. The rarer diagnoses have also been made more frequently than previously. These increases are probably attributable to improved diagnostic methods, greater focus on and more knowledge about the porphyrias, and the effect of family studies.

Some of the new cases of variegate porphyria and hereditary coproporphyria resulted from changes in former porphyria diagnoses, following new biochemical and genetic studies. During the same period, a number of persons who had previously been diagnosed as having porphyria had their diagnosis "removed" because it proved to be based on incorrect interpretation of analytical results.

As the porphyrias are rare, there is little reliable data on prevalence. There may also be large differences in prevalence from population to population or across geographical areas, owing, *inter alia*, to founder effects.

Porphyria cutanea tarda is the most commonly occurring porphyria in the majority of populations (1). The prevalence in our study was similar to that reported from Sweden (10 : 100 000) (9), but higher than in the UK (4 : 100 000)

(4). In most populations, the hereditary form of porphyria cutanea tarda accounts for about 25 % of cases (10 – 13). In our study we found a substantially larger percentage of hereditary cases (60 %). A study from 2009 (3) showed that 74 % of the hereditary cases of porphyria cutanea tarda in Norway are due to two frequently occurring mutations.

In most populations, acute intermittent porphyria is the most frequently occurring acute porphyria. Although the disease has autosomal dominant inheritance, clinical penetrance is low, and it is assumed that only 10 – 20 % of genetically predisposed individuals will ever develop symptomatic disease. A new study examining the incidence of acute intermittent porphyria in several European countries showed a calculated prevalence (estimated on the basis of incidence in countries participating in the study) of symptomatic acute intermittent porphyria of 0.5 : 100 000 (14), which is substantially lower than our estimate (4 : 100 000) and the estimate from Sweden (10 : 100 000, but this includes predictively identified non-symptomatic cases) (15, 16).

The high prevalence in Norway and Sweden is partly due to a founder mutation originating from Arjeplog in Northern Sweden, where the estimated prevalence is 2 000 : 100 000 (15). In Saltdal Municipality in Norway's Nordland County, where this mutation also occurs frequently, the prevalence is estimated at 600 : 100 000 (7). An additional explanation may be that family screening is more easily available in

Norway and Sweden, and more is known about the diseases, with the result that more patients are correctly diagnosed.

Few studies on diagnostic delay in the porphyrias have been conducted, but studies on erythropoietic protoporphyrina in Sweden (17) and the UK (18) have reported 18 and 12 years' delays respectively, compared with 17 years in our study. The disease is diagnostically challenging, not only because it is very rare, but also because the clinical presentation may be a small child who cries and is agitated when exposed to the sun, without this being accompanied by distinct skin lesions (1). This study includes too few patients with erythropoietic protoporphyrina to allow us to investigate whether time to diagnosis is shorter now than in the past, but the studies from Sweden and the UK have failed to demonstrate any change (17, 18).

The amount of monitoring and follow-up needed for the different diagnoses is determined by both the type of porphyria and whether the patient has symptomatic disease or is genetically predisposed without having had symptoms. With most of the porphyrias, it is possible to prevent attacks or relapses. With correct treatment and follow-up, many patients may therefore remain free of symptoms for most of their lives, and complications such as hypertension, renal failure, hepatocellular carcinoma in patients with acute porphyrias (19, 20) and liver failure in erythropoietic protoporphyrina (21) can be detected early.

Despite the fact that all patients who have had symptoms are advised to go for annual check-ups (22), over half of patients with symptomatic acute intermittent porphyria and a third of those with porphyria cutanea tarda report that they never do. In light of this information, NAPOS published detailed diagnosis-specific guidelines in 2010 for the monitoring and follow-up of porphyria patients (22).

In general, there is consistency between the symptoms reported by Norwegian patients in connection with attacks of acute intermittent porphyria and those observed in other studies (5, 23, 24). Acute attacks may be precipitated by a number of factors, such as hormonal changes (e.g. menstruation), unsafe drugs, alcohol, fasting/dieting, psychological and physical stress and other illnesses (4 – 6). The use of drugs (40 %) as a precipitating factor was reported more frequently in our study than in studies from Sweden (20 %) (5) and South Africa (10 %) (6). In addition, 18 % of the women in our study specifically reported contraceptive pills as a precipitating factor.

In particular, participants with acute intermittent porphyria and erythropoietic protoporphyrina reported that they had a reduced quality of life as a result of their disease. These findings must be interpreted with caution, as they are not based on a validated method. A lower quality of life has previously been reported in patients with acute porphyrias compared to healthy individuals and diabetics (25).

Recent studies (17, 18) have shown that patients with erythropoietic protoporphyrina have a severely reduced quality of life, which is partly explained by the long diagnostic delay, major restrictions on daily living and the fact that there are few treatment options. In light of the fact that several of the porphyrias may have long diagnostic delays, may cause severe and/or pronounced distress and are dependent on life-long followup, new studies are needed to assess the need for follow-up and help for porphyria patients at different stages of life.

The strength of the present study is that it provides a comprehensive overview of porphyrias in Norway, including all porphyria patients registered at NAPOS since its establishment in 1999. The study therefore encompasses many patients, despite the fact that it concerns such rare conditions. In addition, the response rate in the Norwegian Porphyria Registry is relatively high, at 70 %. Non-response analyses have not been conducted, but we see that the response rate is higher for women than for men, and also for patients with erythropoietic protoporphyrina. However, it must be taken into consideration that the data included in the registry are patient-reported.

There is still little systematic knowledge of the natural history of the various porphyrias and of treatment efficacy. Many patients with a rare disease report challenging encounters with the healthcare system. The Norwegian Porphyria Registry will use the systematically acquired registry data to develop and implement guidelines that may improve the clinical management of the porphyrias. A joint European porphyria registry, to be managed by NAPOS, was established recently (26). This registry will be capable of encompassing larger numbers of porphyria patients, which will result in more reliable data and in turn a better foundation for evidence-based practice.

**Mira Mykletun (born 1983)**

Human physiologist and registry officer. The author has completed the ICMJE form and reports no conflicts of interest.

**Aasne K. Aarsand (born 1973)**

Specialist in medical biochemistry and senior consultant. The author has completed the ICMJE form and reports no conflicts of interest.

**Egil Støle (born 1975)**

Cand. scient degree in biology and registry officer. The author has completed the ICMJE form and reports no conflicts of interest.

**Jørild Haugen Villanger (born 1974)**

Cand. scient degree in biology and registry officer. The author has completed the ICMJE form and reports no conflicts of interest.

**Mette C. Tollånes (born 1973)**

Post-doctoral position at the Department of Global Public Health and Primary Care, University of Bergen, and has a secondary position as MD. The author has completed the ICMJE form and reports no conflicts of interest.

**Carl Baravelli (born 1979)**

Bachelor of Psychological Science from Australia and registry officer. The author has completed the ICMJE form and reports no conflicts of interest.

**Sverre Sandberg (born 1951)**

Head of the Norwegian Porphyria Centre (NAPOS), head of Norwegian Quality Improvement of Primary Health Care Laboratories outside hospitals (NOKLUS) and Professor at the Department of Global Public Health and Primary Care, University of Bergen. The author has completed the ICMJE form and reports no conflicts of interest.

**REFERENCES**

1. Puy H, Gouya L, Deybach JC. Porphyrias. Lancet 2010; 375: 924 – 37.
2. Aarsand AK. Diagnosing and monitoring the porphyrias. With special emphasis on how to interpret changes in urinary porphobilinogen in acute intermittent porphyria, differentiate sporadic and familial porphyria cutanea tarda and on the performance of porphyria specialist laboratories. Doktoravhandling, Bergen: Universitetet i Bergen, 2012.
3. Aarsand AK, Boman H, Sandberg S. Familial and sporadic porphyria cutanea tarda: characterization and diagnostic strategies. Clin Chem 2009; 55: 795 – 803.
4. Badminton MB, Deacon AC, Elder GH. The porphyrias and other disorders of porphyrin metabolism. I: Burtis CA, Aashwood E, Bruns D, red. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 5. utg. St. Louis, MO: Elsevier Saunders, 2012: 1031 – 52.
5. Bylesjö I, Wikberg A, Andersson C. Clinical aspects of acute intermittent porphyria in northern Sweden: a population-based study. Scand J Clin Lab Invest 2009; 69: 612 – 8.
6. Hift RJ, Meissner PN. An analysis of 112 acute porphyric attacks in Cape Town, South Africa: Evidence that acute intermittent porphyria and variegate porphyria differ in susceptibility and severity. Medicine (Baltimore) 2005; 84: 48 – 60.
7. Tollåli G, Nielsen EW, Brekke OL. Akutt intermitterende porfyri. Tidsskr Nor Lægeforen 2002; 122: 1102 – 5.
8. Petersen NE, Brock A. Akutte porfyrisygdomme. Tidsskr Nor Laegeforen 2000; 120: 1421 – 3.
9. Rossmann-Ringdahl I, Olsson R. Porphyria cutanea tarda in a Swedish population: risk factors and complications. Acta Derm Venereol 2005; 85: 337 – 41.
10. Badenas C, To-Figueras J, Phillips JD et al. Identification and characterization of novel uroporphyrinogen decarboxylase gene mutations in a large series of porphyria cutanea tarda patients and relatives. Clin Genet 2009; 75: 346 – 53.
11. Brady JJ, Jackson HA, Roberts AG et al. Co-inheritance of mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase and hemochromatosis genes accelerates the onset of porphyria cutanea tarda. J Invest Dermatol 2000; 115: 868 – 74.
12. Méndez M, Poblete-Gutiérrez P, García-Bravo M et al. Molecular heterogeneity of familial porphyria cutanea tarda in Spain: characterization of 10 novel mutations in the UROD gene. Br J Dermatol 2007; 157: 501 – 7.
13. Christiansen L, Brøns-Poulsen J, Hørder M et al. Expression and characterization of six clinically relevant uroporphyrinogen decarboxylase gene mutations. Scand J Clin Lab Invest 2005; 65: 227 – 35.

14. Elder G, Harper P, Badminton M et al. The incidence of inherited porphyrias in Europe. *J Inherit Metab Dis* 2013; 36: 849 – 57.
15. Andersson C, Thunell S, Floderus Y et al. Diagnosis of acute intermittent porphyria in northern Sweden: an evaluation of mutation analysis and biochemical methods. *J Intern Med* 1995; 237: 301 – 8.
16. Andersson C. Acute intermittent porphyria in northern Sweden. A population based study. Umeå: Umeå universitet, 1997.
17. Wahlin S, Floderus Y, Stål P et al. Erythropoietic protoporphyrina in Sweden: demographic, clinical, biochemical and genetic characteristics. *J Intern Med* 2011; 269: 278 – 88.
18. Holme SA, Anstey AV, Finlay AY et al. Erythropoietic protoporphyrina in the U.K.: clinical features and effect on quality of life. *Br J Dermatol* 2006; 155: 574 – 81.
19. Andersson C, Lithner F. Hypertension and renal disease in patients with acute intermittent porphyria. *J Intern Med* 1994; 236: 169 – 75.
20. Innala E, Andersson C. Screening for hepatocellular carcinoma in acute intermittent porphyria: a 15-year follow-up in northern Sweden. *J Intern Med* 2011; 269: 538 – 45.
21. Received 13 May 2013, first revision submitted 2 November 2013, accepted 11 March 2014. Editor: Kristin Viste.

Reprinted from original publication (Tidsskr Nor Legeforen nr 8 2014: 134, with permission of Sverre Sandberg)

# Osnovne preiskave za porfirijs – kaj opravljamo v Sloveniji?

## *Basic laboratory investigations for porphyrias – what do we do in Slovenia?*

**Eva Fliser**

UKC Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Maribor, Slovenija

### UVOD

Porfirijs so skupina redkih, večinoma prirojenih bolezni, ki so posledica motnje v biosintezi poti hema. Zmanjšana aktivnost enega ali več encimov, ki uravnava sintezno pot, povzroči akumulacijo presnovkov (porfirinov in/ali njihovih prekurzorjev). Posledica njihove akumulacije so nevrološki, abdominalni ali kožni simptomi.

### LABORATORIJSKE PREISKAVE POFIRIJ, KI JIH OPRAVLJAMO V SLOVENIJI

Diagnostika porfirij vključuje:

- merjenje koncentracije posameznih presnovkov (kvantitativne meritve porfirinov in njihovih prekurzorjev),
- merjenje aktivnosti encimov v sintezni poti hema,
- opravljanje genetskih preiskav za porfirije.

V diagnostiki porfirij so pomembne tako biokemijske kot genetske preiskave. Izvid genetske preiskave potrdi ali ovrže genetsko motnjo za bolezen, vendar ne kaže aktivnost bolezni. Potek akutnega napada in preobčutljivosti kože na svetlobo (fotosenzitivnosti) kot posledice porfirije ugotovimo s pomočjo kvantitativnih meritev presnovkov.

Kvantitativne meritve porfirinov in njihovih prekurzorjev v Sloveniji opravljamo v obeh kliničnih centrih – UKC Maribor (Oddelek za laboratorijsko diagnostiko) ter UKC Ljubljana (Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo). V

obeh ustanovah merimo koncentracijo delta aminolevulininske kisline (delta-ALA), porfobilinogena (PBG), uroporfirina, koproporfirina ter celokupnih porfirinov v trenutnem (priporočljivo v prvem jutranjem) ali časovno zbranem urinu. Koncentracijo protoporfirina določamo v krvi/eritrocitih.

V obeh kliničnih centrih merimo tudi aktivnost enega izmed encimov v sintezni poti hema, to je delta-aminolevulininske kisline dehidratazo (delta-ALAD) ali z drugim imenom porfobilinogen sintazo. Merjenje aktivnosti tega encima opravljamo največkrat v okviru biološkega monitoringa izpostavljenosti svincu; svinec vpliva na sintezo hema na treh različnih stopnjah in povzroča porfirinopatije (pridobljene porfirije – porfirije sekundarnega izvora).

Opravljanje genetskih preiskav za porfirije je v Sloveniji novost. Opravljajo jih v UKC Ljubljana (Klinični inštitut za medicinsko genetiko, Center za nedidiagnosticirane redke bolezni).

# BIOLOŠKI MATERIAL, KI JE POTREBEN ZA BIOKEMIJSKE PREISKAVE PORFIRIJ

Izbira pravilnega biološkega materiala za kvantitativne meritve porfirinov in njihovih prekurzorjev ter merjenje aktivnosti encima delta-ALAD je zelo pomembna, ni pa vedno preprosta. Najpomembnejša lastnost presnovkov v sintezni poti hema, ki vpliva tudi na izbor biološkega materiala za analizo, je njihova topnost. V sintezni poti hema se struktura porfirinov spreminja, prihaja do postopnega izločanja karboksilnih skupin, posledica pa je zmanjševanje (vodo)topnosti presnovkov.

- Koncentracijo porfirinskih prekurzorjev delta-ALA in PBG, presnovkov z začetka sintezne poti, določamo izključno v urinu. V krvi jih ne določamo.
- Koncentracijo prvih porfirinov lahko določamo tako v urinu kot tudi v blatu.

- Koncentracijo porfirinov s konca sintezne poti hema najbolje določamo v eritrocitih, lahko tudi v blatu. V urinu jih ne določamo.

Aktivnosti encimov določamo v krvi, v plazmi pa je možno tudi spremljanje fluorescence posameznih presnovkov.

V navedenih bioloških materialih je možno opravljati številne preiskave. Vseh v Sloveniji ne opravljamo, saj je potrebna bolj zahtevna laboratorijska oprema (HPLC) ter več izkušenj z analizami in interpretacijo izvidov, kot smo jih pri nas deležni glede na majhno incidenco bolezni.

**Tabela 1:** Laboratorijske preiskave porfirij, ki jih opravljamo v Sloveniji

Merjenje koncentracije porfirinov in njihovih prekurzorjev	U, dU U, dU U, dU U, dU U, dU eritrociti (kri-EDTA, heparin)	delta-ALA PBG celokupni porfirini uroporfirini koproporfirini protoporfirin	UKC Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko  UKC Ljubljana, KIKKB
Merjenje aktivnosti encimov v sintezni poti hema	K (EDTA)	delta-ALAD	UKC Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko  UKC Ljubljana, KIKKB
Genetske preiskave	UKC Ljubljana, Klinični inštitut za medicinsko genetiko, Center za nedagnosticirane redke bolezni		

Pri biološkem materialu moramo biti pozorni na stabilnost vzorcev. Porfirini so zelo nestabilni, njihova struktura predvsem pod vplivom svetlobe hitro razpada. Pri nepravilno shranjenih vzorcih porfirini razpadajo že po nekaj urah. Zato je pomembno, da vse vzorce, ne glede na vrsto biološkega materiala, takoj po odvzemenu zaščitimo pred svetlobo. Lahko jih zavijemo v folijo ali shranimo v črne vrečke, uri-

ne shranimo v temni embalaži. Vse vzorce shranujemo na hladnjem in jih čim prej dostavimo v ustrezni laboratorij.

## METODE DOLOČEVANJA BIOKEMIJSKIH PREISKAV PORFIRIJ, KI JIH OPRAVLJAMO V SLOVENIJI

Metode določevanja porfirinov in njihovih prekurzorjev so odvisne od biološkega materiala ter vrste presnovka, ki ga želimo določiti. Vse pa imajo skupen potek – posamezni porfiran ali prekurzor izoliramo in ga nato na osnovi njegove značilne barve/fluorescence ali na osnovi tvorbe obarvanega kromoforja določimo.

Postopki izolacije porfirinov in prekurzorjev iz urina so danes veliko bolj enostavni in tudi manj nevarni glede uporabe nevarnih topil kot še nekaj let nazaj. Uporabljamo ionsko izmenjevalne kolone, iz katerih po specifični vezavi posamezne presnovke spiramo na osnovi njihove različne topnosti. Pridobljeni eluat uporabimo za kvantitativno meritev.

Prekurzorji še nimajo značilne strukture porfirinov in zato tudi ne njihove značilne barve. Eluat u zato dodamo Ehrlichov reagent (p-dimetilaminobenzaldehid v kisli raztopini). S prekurzorem tvori barvo, ki je osnova za spektrofotometrično določitev in merjenje absorbance pri 555 nm. Reakcija z Ehrlichovim reagentom je bila v preteklosti tudi osnova kvalitativnih testov (Watson-Schwartzov ter Hoe-

schov test). Pri porfirinih reakcija z Ehrlichovim reagentom ni potrebna, saj imajo zaradi svoje strukture značilno barvo in fluorescenco; merimo absorbanco pri 400 nm (Soretova linija).

Določitev protoporfirina v eritrocitih poteka v UKC v Mariboru in v Ljubljani nekoliko različno. Osnova je ekstrakcija protoporfirina s pomočjo mešanice organskih topil ter reekstrakcija v nakisano raztopino, brez ionsko izmenjevalnih kolon. Tudi protoporfirin ima značilno rožnato barvo in je osnova sledeči spektrofotometrični ali fluorometrični določitvi.

V primeru pozitivnega kvantitativnega testa je priporočljivo opravljanje nadaljnjih preiskav za določitev vrste porfirije. Kot potrditvene metode se uporablajo HPLC (urin, blato), fluorescenčna spektroskopija (plazma), določitev aktivnosti encimov (kri) ter genetsko testiranje. Opravljanje teh preiskav je možno v centrih za porfirije v različnih evropskih državah.

## LITERATURA

1. European Porphyria Network. <http://porphyria.eu/en/content>
2. Stein P, Badminton M, Barth J, Rees D, Stewart MF. Best practise guidelines on clinical management of acute attacks of porphyria and their complications. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2013; 50:217-223.
3. German Competence Center for Porphyria Diagnosis and Consultation. <http://www.porphyrie.de/kompetenz.html>
4. Porphyria Center Karlsruhe, Germany. Informationen zur Porphyriediagnostik. <http://www.porphyrie.de/info.html>
5. Thomas L. Labor und Diagnose. 6. Auflage, TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main, 2005; 646-659.
6. Kansky A, Glavač D. Erythropoietic protoporphyrin, A short review. *Acta Dermatoven APA*. 2004; vol 13.
7. Sardh E, Gouya L, Bloomer J, Sandberg S, et al. Explore: A prospective, multinational history study of patients with acute hepatic porphyrias (AHP) with recurrent attacks. *Blood*, 2017; 130:2211.

# German experiences with porphyria

**Michael Vogeser**

University Hospital, LMU Munich, Germany

German Association of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL)

In Germany, laboratory testing for outpatients cared for in doctors' offices is mainly performed by a few large laboratory companies. Thanks to very good logistics, samples are easily shipped to centralized specialty testing units where PBG and total porphyrin analyses are available. These laboratory companies generally offer their service during standard working hours, but in many cases the mentioned analyses are only performed once or twice a week for economic reasons. Urgent requests are frequently not accepted for special diagnostic parameters.

The number of hospital laboratories performing PBG testing cannot be given precisely but is limited. For the Munich area two university hospitals offer 24 h PBG testing for the whole region with approx. 2.5 mio residents. In our experience, however, urgent requests are very rare.

Comprehensive testing for porphyria is offered only by a few laboratories. The task of these laboratories is to confirm preliminary diagnoses based mainly on screening tests and to perform all analyses necessary for a complete differential diagnosis of the different types of porphyria, if indicated, including also molecular genetic testing. The specialized laboratories also offer detailed information about diagnostic procedures and interpretation of the test results as well as assistance or advice for treatment and management of patients. The analytical and diagnostic quality is checked and verified by an EQAS proficiency testing organized by the European Porphyria network EPNET. Proficiency testing for measurement of PBG, ALA, total porphyrins, and differentiation of porphyrins is also provided by INSTAND e.V. (Düsseldorf) as a scientific society.

In Germany as well as in other European countries there is increasing awareness of issues related to rare diseases. Respective programs predominantly address pediatrici-

ans (e.g., the *Care-for-Rare* initiative of the LMU Munich). Consequently, since many porphyrias (especially of the hepatic type) typically don't occur during childhood, porphyria is at risk to be under-addressed. Due to the heterogeneous and not organ-specific symptomatology of acute porphyrias, no clinical discipline is evidently or necessarily linked to porphyria.

The German Association of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL) has implemented a working group for porphyria diagnostics. Activities include lectures at the annual conferences, the offer for de-central up-date events for clinicians and support for research projects related to porphyrias. Currently the development of a novel point-of-care porphyria testing system is a main project. The efforts to establish a case registry for porphyria patients didn't succeed because of hurdles due to privacy protection so far.

The German distributor of haemarginate plays a significant role to maintain and increase the awareness of porphyria based on marketing visits in hospitals of all categories.

There is no reliable database available to allow estimates about the efficiency and coverage of porphyria testing and diagnostic work-up in Germany. The availability of testing seems to be in general not a relevant issue in Germany. It seems more likely that the awareness of acute porphyria among clinicians remains to be improved. A particular problem is in our experience that the diagnosis of hepatic porphyria is given to patients with increased porphyria excretion due to various reasons (so called secondary porphyrinuria); consequently, the burden of wrong diagnoses with negative impact on the quality of life of affected individuals is relevant. Also this pleads for an optimized training of physicians in general with respect to porphyrias.



## 04

Diagnostika  
"od spočetja  
do rojstva"

# Sodobni pristopi pri obravnavi neplodnosti

**Milan Reljič**

UKC Maribor, Oddelek za reproduktivno medicino in ginekološko endokrinologijo,  
Kinika za ginekologijo in perinatologijo, Maribor, Slovenija

## UVOD

Neplodnost je opredeljena kot nezmožnost zanositve po enem letu rednih nezaščitenih spolnih odnosov. Težave z zanositvijo ima 15 % parov ali vsak sedmi par. Pojavnost neplodnosti je odvisna od starosti, predvsem žensk. Tako

je v starosti do 30 let neploden vsak deseti, v starosti 40 let pa že vsak četrti par. Kljub splošnemu vтisu, da je neplodnosti vedno več, pa podatki kažejo, da se pojavnost v zadnjih 30–40 letih ni bistveno spremenila.

## VZROKI NEPLODNOSTI

Čeprav se pojavnost neplodnosti ni pomembno spremenila, se je spremenilo razmerje med posameznimi vzroki. Več je vzrokov neplodnosti pri moških, tako da so moški in ženski vzroki neplodnosti po pogostosti izenačeni. Pri četrtini parov odkrijemo vzrok neplodnosti pri ženski, pri četrtini pri moškem, pri četrtini pri obeh in pri četrtini parov ne najdeno vzroka neplodnosti. Najpogosteji vzroki neplodnosti pri ženski so poškodovani jajcevodi, motnje ovulacije in endometrioza. Motnje ovulacije so v večini posledica sindroma policističnih jajčnikov in prekomerne ali prenizke telesne teže. Poškodbe jajcevodov pa so posledica vnetij v mali medenici, ki jih povzročajo spolno prenosljivi mikroorganizmi, kot je klamidija trahomatis. Pogost vzrok neplodnosti je tudi endometrioza oziroma pojav maternične

sluznice izven maternične votline. Endometrioza povzroči nastanek zarastlin v mali medenici, motena sta oploditev in razvoj zarodkov. Zaradi neplodnosti vse pogosteje obravnavamo ženske v pozrem reproduktivnim obdobju, ko je neplodnost lahko že posledica staranja jajčnikov in slabe kakovosti jajčnih celic. Neplodnosti moških je praviloma posledica slabe kakovosti semenskega izliva, ki se kaže v znižani koncentraciji, slabši gibljivosti, nižjem deležu pravilno oblikovanih semenčic. Vzroki za slabšo kakovost semenskega izliva so lahko različni: genetski, prirojene motnje v spuščanju testisov, poškodbe, imunološki vzroki, prebolela vnetja mod, škodljivi vplivi okolja, poklicna izpostavljenost vročini in hormonskim motilcem ter nezdrav način življenja.

## OBRAVNAVA NEPLODNOSTI

Parom svetujemo obravnavo neplodnosti po letu dni neuspešnega prizadevanja za zanositev. Z obravnavo neplodnosti pa lahko pričnemo tudi prej, če so prisotni znaki ali razpolagamo s podatki, ki kažejo na neplodnost, kot je to pri ženskah, starejših od 40 let, pri ženskah, ki nimajo menstruacij ali so že večkrat prebolele vnetja v mali medenici itd.

V ambulanti za neplodnost obravnavamo par kot celoto. Čeprav vrsto in zaporedje preiskav individualno prilagajamo, sledimo uveljavljenim načelom obravnave. Diagnostika neplodnosti je stopenjska, kar pomeni, da pričnemo s preiskavami, ki so manj invazivne in za paciente manj obremenjujoče in se na osnovi njihovih rezultatov odločimo za

nadaljnje postopke. Prizadevamo si, da je teh stopenj čim manj ter da hitro ugotovimo vzrok neplodnosti. Preiskave se pričnejo po izčrpni anamnezi para. Pri ženski najprej opravimo vaginalni ultrazvočni pregled in laboratorijske preiskave. Odvzamemo krv za določanje hormonov (FSH, LH, PRL, AMH, TSH) in prisotnosti protiteles na spolno prenosljive bakterije. Pri partnerju opravimo klinični pregled in pregled kakovosti semenskega izliva vsaj dvakrat v

razmiku dveh mesecev. Če so izvidi teh preiskav v mejah normale, sledi preverjanje prehodnosti jajcevodov in ugotavljanje zarastlin ter endometrioze s slikovnimi (histerosalpingosonografija, histerosalpigografija) in endoskopskimi metodami (klasična in transvaginalna laparoskopija). Z endoskopskimi preiskavami se diagnostika običajno konča in se prične zdravljenje.

## ZDRAVLJENJE NEPLODNOSTI

Neplodnost zdravimo z zdravili (hormoni), operativnimi posagi in postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo (OBMP). Vedno si prizadevamo odkriti vzroke neplodnosti in jih odpraviti, tako da pride do zanositve po naravni poti. Pri motnjah menstruacijskega ciklusa in ovulacije z zdravili in/ali operativno terapijo lahko dosežemo normalen razvoj jajčnih mešičkov in ovulacijo. Pri zamašenih jajcevodih in zarastlinah v mali medenici z operativnim posegom jajcevode odpremo in odstranimo zarastline. Tudi pri endometriozji je potrebno operativno zdravljenje, in sicer odstranitev ali uničenje endometriotskih žarišč in razrešitev zarastlin, ki so jih ta povzročila. Če tudi leto dni po operativni terapiji ne pride do zanositve, nadaljujemo zdravljenje s postopki zunajtelesne oploditve. Tudi pri zdravljenju moške neplodnosti si prizadevamo poiskati vzrok in ga odpraviti, vendar ga v večini primerov ne odkrijemo ali ga ne moremo odpraviti. Čeprav pogosto ne uspemo izboljšati kakovosti semenskega izliva, pa moško neplodnost uspešno zdravimo tako, da pomagamo semenčicam oploditi jajčne celice v postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo.

### **Postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo (OBMP)**

Med postopki OBMP ločimo zunajtelesno oploditev, to je vnos semenčic v maternično votlino (postopki intrauterine inseminacije – IUI), in zunajtelesno oploditev (IVF), pri kateri opravimo združitev jajčnih celic s semenčicami zunaj telesa ženske in nato tako nastale zarodke prenesemo v maternico. Svetujemo jih takrat, ko je vzročni način zdravljenja ženske in moške neplodnosti neuspešen, ter pri nepojasnjeni neplodnosti. IUI je med postopki OBMP najmanj invazivna in najprijaznejša metoda, zato jo uporabimo prvo pred prehodom na zahtevnejše postopke, kot sta IVF in ICSI. Vendar je IUI primerena le pri zdravljenju

nepojasnjene neplodnosti, motenj ovulacije in blage oblike moške neplodnosti, medtem ko so IVF postopki uspešni pri vseh oblikah neplodnosti.

Zaradi povečanja uspešnosti OBMP jajčnike spodbujamo s hormonskimi zdravili in obliki tablet ali podkožnih injekcij. Z večkratnimi ultrazvočnimi pregledi spremljamo rast jajčnih mešičkov, ki v povprečju traja 10–14 dni. Ko ti dosežemo primerno velikost in vsebujejo zrele jajčne celice, sprožimo ovulacijo, iz partnerjevega semena pridobimo gibljive semenčice in jih prenesemo v maternično votlino (IUI). Pri postopkih zunajtelesne oploditve pa po sprožitvi ovulacije naredimo ultrazvočno vodeno punkcijo, posrkamo vsebi no jajčnih mešičkov ter tako pridobimo jajčne celice. Iz semena partnerja izoliramo semenčice in jih dodamo jajčnim celicam (klasični IVF postopek), ali pa jih v primeru premajhnega števila in slabše kakovosti vnesemo neposredno v citoplazmo jajčne celice (ICSI postopek). Ko dosežemo oploditev, spremljamo razvoj zarodkov, ki poteka v inkubatorju. Tri ali pet dni po oploditvi izberemo enega ali dva najboljša zarodka in ju z drobno cevko prenesemo v maternično votlino. Nadstevilne zarodke zamrzemo.

### **Uspešnost zdravljenja neplodnosti**

V večini primerov smo pri zdravljenju neplodnosti uspešni. Pri polovici parov uspemo odpraviti vzrok neplodnosti in omogočiti zanositev po naravni poti. Pri drugi polovici parov pa dosežemo zanositev s postopki OBMP. Vendar tudi uspešnost teh postopkov ni tako visoka, kot bi si želeli. V enem postopku IUI zanos 10–15 %, v enem IVF postopku pa 30–40 % parov. Možnost zanositve ni pri vseh parih enaka, temveč je odvisna od številnih dejavnikov, kot so vzrok neplodnosti, stopnja okvare spolnih organov, starost in predvsem kakovost spolnih celic. Tako je možnost za

zanositev pri nekaterih parih večja od povprečne, pri drugih pa bistveno zmanjšana, npr. tudi pod 10 %. Prognostične dejavnike za uspešnost zdravljenja individualno ocenimo in se s pari o tem pogovorimo. Razložimo jim tudi, da ne poznamo in nimamo vpliva na vse procese, ki privede-

jo do zanositve, ter da je nepredvidljivo, kdaj bo postopek uspešen. Do zanositve lahko pride že po prvem razgovoru v ambulanti ali pa šele po številnih neuspešnih postopkih zunajtelesne oploditve.

## ZAKLJUČEK

Neplodnosti sproži pri paru intenzivna negativna občutja in čustveno prizadetost. Občutijo jezo, krivdo, žalost, osamljenost, razočaranje in nemoč. Skrbi jih, da se jim ne bo nikoli izpolnila življenjska želja po potomstvu. Ta negativna čustva pa ne vplivajo le na kakovost njihovega življenja,

temveč tudi na uspešnost zdravljenja. Zato je pomembno, da parom ne nudimo le najsdobnejših metod zdravljenja, temveč tudi psihološko oporo in jih spodbujamo na poti do uspeha, ki praviloma vodi tudi preko razočaranj.

## LITERATURA

- Knez J, Vlaisavljević V. Ženska neplodnost. V: Takač I (ur.), et al. Ginekologija in perinatologija. 1. izd. Maribor: Medicinska fakulteta. 2016, str. 170-179.
- Reljič M, Kovač V, Gavrić Lovrec V. Kaj moramo vedeti o neplodnosti. 1. izd. [Ljubljana]: Slovensko društvo za reproduktivno medicino, 2014.
- Reljič M, Kovačič B, Mlakar L, Hojnik N, Roglič P, Taborin M, Zafošnik M. Zunajtelesna oploditev. 1. izd. [Ljubljana]: Slovensko društvo za reproduktivno medicino, 2014.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. Fertil Steril. 2012;98(2):302-307.
- National Collaborating Centre for Women's and Children's Health. Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems. London, United Kingdom: National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE); February 2013:1-63.

# Laboratorijske metode OBMP

**Borut Kovačič**

UKC Maribor, Maribor, Slovenija

## UVOD

Pod pojmom izventelesna oploditev uvrščamo laboratorijske postopke, s katerimi poskušamo doseči združitev jajčne celice in semenčice v pogojih in vitro. Tem postopkom se je pridružilo še več laboratorijskih obdelav spolnih celic ali zarodkov, kot so zamrzovanje, genetsko pregledovanje zarodkov, zorenje jajčnih celic in vitro ipd. Vse te metode se

izvajajo v laboratoriju, ki ima status terapevtskega laboratorija. Za gojenje spolnih celic in zarodkov se uporablajo komercialna sintetična ali polsintetična gojišča, ki vsebujejo različne kombinacije aminokislin, energetskih molekul, rastnih faktorjev, vitaminov, antioksidantov, antibiotikov in najpogosteje tudi albumine.

## SEMENČICE IN VITRO

### Priprava semenskega vzorca za postopke art

vsak semenski ali testikularni vzorec je pred uporabo v klinični praksi treba v laboratoriju pregledati, oceniti prisotnost živih semenčic in ga pripraviti s separacijskimi po-

stopki (metoda swim up), s katerimi od ostalega semena izoliramo v gojišče samo gibljive semenčice.

### Zamrzovanje semena in tkiva testisa

seme ali košček testisa zamrzujemo z namenom ohranjanja reproduktivnega potenciala moškega v različnih primerih: pri pacientih pred kemoterapijo ali obsevanjem, pred sterilizacijo ali orhidektomijo, pri dokazanem zmanjševanju števila semenčic v izlivu, v primerih kriptospermije, ko je v

semenu le nekaj semenčic, ali pa v primerih motenj ejakulacije in morebitne odsotnosti partnerja v času zdravljenja. Seme zamrzujemo v tekočem dušiku na -196 °C. V povprečju po odmrzovanju polovico gibljivih semenčic izgubi sposobnost gibanja.

## JAJČNE CELICE IN VITRO

Jajčne celice ali oocite najdemo v aspiratu jajčnih mešičkov vedno v kompleksu cumulusa oophorusa – morfološko preobraženih granuloznih celic, ki obdajajo jajčno celico. Oociti so zelo občutljivi na temperaturne spremembe, zato jih

čim prej prenesemo v gojišče in v inkubator. Potem ko celica doseže metafazo II, mora biti oplojena v naslednjih 12 urah.

## In vitro maturacija oocitov

je metoda, ki jo priporočajo pri pacientkah, neprimernih za hormonsko stimulacijo zaradi nevarnosti ovarijске hiperstimulacije. Nezrele oocite z nerazvitim kumulusom zorimo v gojišču z dodanimi gonadotropini in serumom. Celice, ki so dozorele po 24 urah, osemenimo z IVF ali ICSI. Kasneje dozorele celice niso uporabne. V literaturi so velike razlike v uspešnosti (1 do 30 % rojstev na punkcijo).

# OPLODITEV IN VITRO

V širšem pomenu je oploditev in vitro ime za metode, s katerimi poskušamo združiti moške in ženske spolne celice in doseči razvoj zarodka.

## IVF

V ožjem pomenu pripada ime in vitro fertilizacija (IVF) osnovni metodi, pri kateri izolirani jajčni celici, obdani s celicami kumulusa oophorusa, dodamo kapljico prečiščenega semena, ki vsebuje okoli 150.000 do 200.000 dobro gibaljivih semenčic.

## Zamrzovanje oocitov

metoda zamrzovanja jajčnih celic je bila desetletja samo v eksperimentalni fazi. Težavo so predstavljeni mikrotubuli delitvenega vretena in citoskeleta, ki se pri nizkih temperaturah razgradijo. Z uvedbo vitrifikacije – nove oblike krioprezervacije, pa se je uspešnost preživetja izboljšala in danes služi predvsem kot metoda shranjevanja darovanih jajčnih celic.

## ICSI

ali intracitoplazmatsko injiciranje spermija v jajčno celico je metoda, ki so jo sprva uporabljali v primeru težke moške neplodnosti in neoplojenosti po predhodnih IVF postopkih. Danes se indikacije za uporabo ICSI razširjavajo tudi na primere, kot so oligo- in asthenozoospermija in idiopatska neplodnost. Na mikroskopu z mikromanipulatorjem z injekcijsko kapilaro ulovimo spermij in ga posezamo v kapilaro ter prenesemo v citoplazmo jajčne celice. Uporabimo lahko spermatozoide iz ejakulata, odmrznjenega semena, retrogradne ejakulacije, epididimisa, testisa ali odmrznjenega koščka testisa.

# ZARODKI IN VITRO IN IZBOR ZA EMBRIOTRANSFER

## Zigote

v IVF postopku se mora delež oplojenih jajčnih celic gibati okoli 60 %. Ker pri ICSI osemenimo samo zrele celice, je tukaj delež oplojenosti višji in znaša nad 70 %. Oplojenost ocenjujemo 18–20 ur po osemenitvi, ko se v sredini jajčne celice pojavitva moški in ženski pronukleus. Ta stopnja razvoja se imenuje zigota.

## Zgodnji predimplantirani zarodki

dva dni po uspešni osemenitvi (po 48 urah) se iz zigote razvije zarodek, ki znotraj ovojnice (zone pellucide) vsebuje od 2

do 4 celice ali blastomere. Citoplazma se med delitvijo celic ne porazdeli vedno enakomerno (različno velike blastomere). Še pogosteje pa se med delitvijo nekaj citoplazme brez jedra obda z membrano (fragmenti). Delež fragmentov v zarodku odraža razvojni potencial zarodka. Ocenjevanje morfologije, morfodinamike brazdanja zarodka in posledično vitalnosti in implantacijskega potenciala zarodkov je pomemben del IVF postopka, saj se v povprečju polovica zarodkov preneha deliti v prvih petih dneh razvoja. Na tej osnovi se odločamo, katere zarodke in koliko jih bomo prenesli v maternico in katere bomo zamrznili. Pri večjem številu morfološko kakovostnih zarodkov je smiselno zaroake gojiti 5 dni do blastociste.

## Blastociste

v optimalnih pogojih in vitro doseže to stopnjo le dobra polovica vseh zarodkov. Tudi blastociste se močno razlikujejo po kakovosti. Pri izbiri blastocist za klinično rabo izbiramo tiste s čim bolj normalno notranjo celično maso, iz katere se kasneje razvije plod.

Vse več državah se pri mlajših ženskah odločajo za prenos le enega ali največ dveh zarodkov. Sicer sta število in starost zarodkov, ki jih prenesejo v maternico, odvisna od doktrine vsakega IVF centra posebej. Načeloma velja, da je s podaljševanjem gojenja zarodkov mogoče bolje izbrati vitalne zarodke, saj se vsak dodaten dan nekaj zarodkov preneha deliti, najpogosteje zaradi genetskih napak, ki jih vsebujejo.

## ZAMRZOVANJE/ODMRZOVANJE ZARODKOV

Nadštevilne zarodke, ki jih nismo prenesli v maternico, zmrznemo v tekočem dušiku na -196 °C z metodo vitrifikacije in ob uporabi krioprotектantov. Po odmrzovanju prib-

ližno 90 % zarodkov ohrani obliko, kot jo je imelo pred zamrzovanjem. Sposobnost odmrznenih zarodkov za implantacijo je primerljiva s sposobnostjo implantacije svežih.

## BIOPSIJA ZARODKOV ZA PREDIMPLANTACIJSKO GENETSKO DIAGNOSTIKO (PGD)

Incidence kromosomskih anomalij oocitov so zelo pogoste. Približno 25 % vseh jajčnih celic je aneuploidnih, s tem pa so aneuploidni tudi zarodki. Številčne kromosomske nepravilnosti lahko ugotavljamo na biopsiji prvega ali drugega polarnega telesa in na biopsiji blastomere iz 8-celičnega zarodka ali biopsiji trofektoderma blastociste, vendar so ocene genetskih preiskav na aneuploidije nezanesljive, saj je

vedno lahko določen del zarodka kromosomsko normalen. Najpogostejsa oblika kromosomskih nepravilnosti zarodka so mozaične aneuploidije (30 % vseh zarodkov). PGD se danes ne uporablja več toliko za odkrivanje številčnih kromosomskih napak, temveč samo še za odkrivanje strukturnih kromosomskih nepravilnosti in dednih bolezni.

# Laboratorijska diagnostika pred in med nosečnostjo

**Evgenija Homšak**

UKC Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Maribor, Slovenija

## UVOD

Kljub temu, da je spočetje in rojstvo otroka fiziološko narančen proces, pa ga spremljajo številne pasti in težave, ki se lahko pojavijo od same zanositve do rojstva otroka. Laboratorijska diagnostika ima pomembno vlogo tako pri odkrivanju in opredelitvi vzrokov težav zanositve in neplodnosti bodočih staršev, kot spremeljanju zdravstvenega stanja bodoče matere pred in med nosečnostjo ter morebitnih pridruženih ali prirojenih bolezni, ki lahko vplivajo na zdravje matere ter razvoj in rojstvo zdravega otroka in ga ogrozi-

jo. V ta namen določamo različne biokemijske parametre, ki na neinvaziven način, ob uporabi drugih diagnostičnih metod in postopkov (ultrazvočna slikovna diagnostika, meritve tlakov, ...) omogočajo odkriti in opredeliti pomembna odstopanja ali celo napovedati morebitno tveganje za razvoj dogodkov, ki lahko ogrožajo življenje tako matere kot ploda v vseh obdobjih nosečnosti (prvo, drugo in tretje tromešecje) in zahtevajo vsako zase posebno obravnavo in spremeljanje (pričakovanih in nepričakovanih) sprememb.

## PRED ZANOSITVIJO

Pred zanositvijo je pomembno oceniti zdravstveno stanje matere in v primeru že znanih dednih bolezni v družini tako pri materi kot očetu opraviti tudi genetske preiskave za oceno tveganja za njihov prenos (genetske bolezni, anomalije Hb, cistična fibroza). Med laboratorijske preiskave, ki jih opravimo za oceno zdravstvenega stanja matere, sodijo preiskave za določitev diabetesa tipa II (glukoza, HbA1c), preverimo pa tudi prisotnost morebitnih virusnih infektivnih bolezni, ki lahko škodijo plodu (rubela, HIV, gonoreja, klamidija, sifilis, hepatitis, varicela zoster, toksoplazmoza) in morebitno prisotnost ali visoko tveganje za razvoj raka materničnega vrata (Pap, HPV).

Kadar nastopijo težave z zanositvijo, je zelo pomembna ocena plodnosti para. Vzroki neplodnosti so zelo kompleksni. Prisotni so tako pri materi kot pri očetu in to v enakem razmerju ali pa jih ni mogoče opredeliti. Dodaten dejavnik je še starost, pri kateri se pari odločajo za zanositev, ki se pomicata vedno višje in s tem povzroča slabšo uspešnost zanositve in večje tveganje za anomalije ploda. Zato je tudi pomembna obravnavava tako bodoče matere kot očeta. Zaradi

neplodnosti tako vse pogosteje obravnavamo ženske v poznam reproduktivnim obdobju, ko je neplodnost lahko že posledica staranja jajčnikov in slabe kakovosti jajčnih celic. Zato v ta namen pri materi določamo anti mullerjev hormon (AMH), ki omogoča oceno ovarijske rezerve (v primeru znižanih vrednosti je znižana ovarijska rezerva, ki se kaže z manjšim številom primordialnih foliklov, ki so na razpolago za potencialne oplojene jajčne celice) in prisotnost policističnih ovarijev (v primeru izrazito zvišanih vrednosti). Ob tem je v pomoč tudi določitev inhibina A, ki je razen AMH v pomoč pri ocenitvi uspešnosti asistirane reprodukcije z zunajtelesno oploditvijo. Za oceno ustreznegra menstrualnega cikla se določajo tudi v serumu prisotni hormoni: estradiol, progesteron luteinizirajoči hormon (LH), folikle stimulirajoči hormon (FSH) in prolaktin. Vzroke ovarijske disfunkcije je mogoče opredeliti tudi s pomočjo določitve ščitničnih hormonov (TSH, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, anti-TPO, TR-Pt), ki omogočajo diagnostiko bolezni ščitnice (Cushing, Addisonova bolezen, hipo- in hipertiroidizem). S pomočjo določitve kortizola, steroidnih, androgenih hormonov (DHEA-s, testosteron, SHBG, androstendion, ACTH), pa opredelju-

jemo hiperandrogenemijo pri policističnem ovariju, kon genitalni adrenalni hiperplaziji ali prirojenem pomanjkanju encima 21-hidroksilaze.

Neplodnost moških je praviloma posledica slabe kakovosti semenskega izliva, ki se kaže v znižani koncentraciji, slabši

gibljivosti, nižjem deležu pravilno oblikovanih semenčic. Z določitvijo hormonov inhibina B, ki ga producira sertolijevi celice v testisih, lahko opredelimo funkcionalno sposobnost testisov in spermatogenezo (nizka raven v odsotnosti spermatogeneze). Dodatno opredelitev omogočata LH in FSH, ki vplivata tudi na sintezo testosterona v Lydigovih celicah.

## PRVO TRIMESEČJE (1.–12. TEDEN NOSEČNOSTI)

Ob zanositvi je prvi biokemijski kazalec zvišana raven hor mona HCG, ki ga pričnejo producirati trofoblastne celice. Le-ta je odgovoren tudi za prve znake: slabost, bruhanje. Določimo ga lahko v serumu ali urinu z različnimi metodami, vključno s hitrim testom. Pri tem na izmerjeno koncentracijsko raven hormona pomembno vpliva izbor metode z različnim naborom protiteles, ki so lahko usmerjena proti različnim delom molekule (intaktne ali fragmentom) HCG in na ta način vplivajo na specifičnost in občutljivost testa. Zato je za spremjanje poteka nosečnosti pomembno, da koncentracije določamo na istem analizatorju. Za HCG je značilno, da se v primeru normalne nosečnosti koncentracijska raven s časom eksponentno zvišuje, pri čemer se koncentracija podvoji v dveh do treh dneh do 9. tedna, ko začne raven upadati.

V 11. do 14. tednu nosečnosti je pomembno izvajanje presejalnega dvohormonskega testa za določitev tveganja genskih anomalij ploda (Downov sindrom (trisomija 21) Edwardsov sindrom (trisomija 18)). Z določitvijo PAPP-A (*Pregnancy-associated plasma protein-A*) in prostega (ali celokupnega) HCG, ob upoštevanju z UZ izmerjene nuhalne svetline, lahko s 85- do 90-odstotno verjetnostjo opredelimo tveganje. Ob patoloških vrednostih izračuna tveganja opravimo pregled horionskih resic na kromosomske anomalije.

Ob vsem tem pa je pomembno še spremjanje zdravstvenega stanja nosečnice z določitvijo KKS (morebitna anemija), glukoze, morebitne proteinuri ali glukozurije, TSH in morebitnih protiteles proti Rh antigenom pri plodu.

## DRUGO TRIMESEČJE (13. –27. TEDEN NOSEČNOSTI)

Od 15. do 20. tedna nosečnosti izvajamo trojni (HCG, AFP, nekonjugiran estriol) ali četverni (dodan je še inhibin A) hormonski test za oceno tveganja kromosomskih bolezni ali okvare nevralne cevi. Pri tem je občutljivost trojnega hormonskega testa za Downov sindrom 69-odstotna, ob uporabi četvernega pa zraste na 81 %.

V tem obdobju je izredno pomembno oceniti tveganje za razvoj nosečniškega (gestacijskega) diabetesa. Le-ta se pojavi pri 3 do 5 % nosečnic in nastane kot posledica vpliva hormonov posteljice na inzulinsko odpornost (rezistenco). V večini primerov po porodu izzveni, poveča pa tveganje

za razvoj diabetesa tipa II v kasnejšem obdobju. Če je ocenjeno tveganje za razvoj diabetesa že v 1. trimesečju (glukozurija), je pomembno to tveganje oceniti tudi v 2. trimesečju (v 24.–28. tednu). V ta namen opravljamo presejalni test obremenitve z glukozo (75g) OGTT. Pri tem v serumu nosečnice koncentracija glukoze na tešče ne sme presegati 5,1 mmol/L, po eni uri < 7,8 in po dveh urah mora biti < 11 mmol/L

## TRETJE TRIMESEČJE (28. TEDEN DO PORODA)

### Preeklampsija

Razen spremeljanja tveganja za razvoj gestacijskega diabeta je pri materi pomembno oceniti tudi tveganje za razvoj preeklampsije. Preeklampsija je sistemski sindrom, ki se pojavi v nosečnosti (v 3–5 %) po 20. tednu gestacije in predstavlja pomemben delež vzrokov smrti nosečnic. Tveganje označujejo različni simptomi, ki se lahko pojavijo že v 1. tednu nosečnosti: visok pritisk ( $\geq 140/90 \text{ mmHg}$ ), proteinurija ( $\geq 300 \text{ mg/24h}$ ), otekanje in glavoboli. V primeru razvoja zapletov pride do akutne odpovedi ledvic, možganskih krčev (v 2 %), pulmonalnega edema in do razvoja HELP sindroma (hemoliza, akutna jetrna okvara, nizki trombociti) ali celo do možganskega edema in smrti. Pri plodu se kot posledica zapletov pojavi zastoj rasti in razvoja, oligohidramnion, luščenje posteljice, prezgodnji porod, nizka porodna teža, okvara ledvic ali celo znotrajmaternična smrt.

Pojav preeklampsije je v neposredni povezavi s posteljico, ki ne razvije zadostnega ožilja za potrebe ploda in širše endotelijске okvare, ki ima za posledico vazkonstrikcijo in ishemijo končnih organov (ledvice, pljuča, jetra, možgani). Pri tem ima pomembno vlogo nastanek topnih receptorjev (antiangiogenih faktorjev): s-Flt1 (cirkulirajoči topni receptor žilnih (VEGF) in placentarnih rastnih faktorjev (PLGF)) ter sEndoglin (cirkulirajoči topni antagonist TGF), ki preprečujejo potreben razvoj in transformacijo endotelijskih celic posteljice do visoko-kapacitivnega ožilja posteljice preko invazivnih citotrofoblastov (kar sicer omogoča visoko perfuzijo za potrebe ploda). Porušeno razmerje rastnih faktorjev ožilja in posteljice ter njenih antagonistov – topnih receptorjev vpliva na razvoj neustreznega ožilja, kar ima za posledico razvoj neustrezne posteljice in preeklampsije. Tako v serumu določamo prisotnost ( $s$ )Flt1 in ( $s$ )PLGF ter njunega razmerja. Pri tem je tveganje večje, ko je razmerje Flt1/PLGF večje od 85 (napoved z 82-odstotno občutljivostjo in 95-odstotno specifičnostjo).

### ZAKLJUČEK

Laboratorijska diagnostika s široko paleto biokemijskih parametrov, z ustreznimi analitičnimi metodami in ustrezno analitično in klinično občutljivostjo zaznavanja zgodnjih sprememb, tudi pred razvojem kliničnih znakov, pomembno prispeva k odkrivanju in spremljanju dejavnikov,

ki vplivajo na zanositev ter k prepoznavi tveganja in patoloških sprememb med nosečnostjo, ki lahko vodijo do neželenih zapletov tako pri razvoju ploda kot stanja matere. Na ta način zagotavlja tudi večjo varnost poteka same nosečnosti do rojstva zdravega otroka.

### LITERATURA

1. Gabbe, Steven G., Niebyl, Jennifer R., Simpson, Joe L. *Obstetrics: Normal and problem pregnancies*. Philadelphia: Churchill Livingstone- An Imprint of Elsevier Science, 2002. str. 7-9, 26-28
2. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, et al. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. *Hum Reprod Update* 2014.
3. Iliodromiti S, Kelsey TW, Anderson RA, Nelson SM. Can anti-Mullerian hormone predict the diagnosis of polycystic ovary syndrome? A systematic review and meta-analysis of extracted data. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98: 3332-40.
4. La MA, Sighinolfi G, Radi D, et al. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 2010;16: 113-30.
5. Cole, Laurence A. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010, vol.1 no. 102
6. Benjamin TD, Pridjian G. Update on gestational diabetes. *Obstetrics and Gynecology Clinics*. 2010; 27 (2): 255-267.
7. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005;365:785-799.
8. De Vivo A, et al. Endoglin, PI GF and sFlt-1 as markers for predicting pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol* 2008;87:837-42.

# Prenatalna genetska diagnostika v laboratoriju za medicinsko genetiko UKC Maribor

**Nadja Kokalj Vokač**

UKC Maribor, Maribor, Slovenija

Prenatalna genetska diagnostika pomeni analizo ploda pred rojstvom, z namenom, da bi ugotovili, ali ima plod določene genetske nepravilnosti, ki lahko vplivajo na njegov duševni in telesni razvoj po rojstvu, oziroma določene genetske bolezni. Presejalni testi, kot so ultrazvočna preiskava in nekateri krvni testi, so pogosto del rutinske prenatalne oskrbe, ki z določeno verjetnostjo nakažejo genetsko napako. Ultrazvočna preiskava in preiskave ravni hormonov (dvojni, trojni in četverni

hormonski testi) pri materi ter neinvazivno prenatalno testiranje (NIPT) fragmentov DNA ploda v serumu materine krvi pomagajo ugotoviti, ali so potrebni bolj invazivni prenatalni genetski testi (biopsija horionskih resic in amnionenteza). Običajno te bolj invazivne teste opravimo, če imajo pari povečano tveganje, da bi imeli otroka z gensko ali kromosomske napako.

## Nekateri razlogi za prenatalno diagnostiko:

- nosečnice, ki so starejše od 37 let,
- pozitiven presejalni test,
- pozitiven rezultat neinvazivnega prenatalnega testiranja,
- ultrazvočno ugotovljene razvojne nepravilnosti pri plodu,
- starši s kromosomskimi nepravilnostmi,
- starši, ki že imajo otroka s kromosomske nepravilnostjo,
- eden od staršev je nosilec uravnovežene kromosomske preureeditve,
- recesivna genetska bolezen v družini,
- na kromosom X vezane bolezni.

## Metode genetske diagnostike, ki se uporabljajo v Laboratoriju za medicinsko genetiko UKC Maribor:

V Laboratoriju za medicinsko genetiko opravljamo genetsko diagnostiko po invazivnem odvzemu materiala iz plodne vode ali biopsije horionskih resic s klasično kariotipizacijo. V primeru povečanega tveganja za najpogosteje kromosomske spremembe po odvzemu takoj izoliramo DNA ploda in naredimo hitri test z metodo QF-PCR (kvantitativni fluorescenčni PCR) za najpogosteje aneuploidije autosomnih (13, 18 in 21) in spolnih kromosomov. Vedno sledi klasična citogenetska diagnostika oz. kariotipizacija po gojenju celič ploda v celični kulturi in izdelavi kromosomskih preparatov. Če je treba, opravimo tudi dodatno molekularno citogenetsko diagnostiko, analizo FISH (fluorescenčna in situ hibridizacija) za specifične kromosome, kromosomske regije oz. gene, ali pa molekularno kariotipizacijo, to je analiza na mikromrežah. Z uvedbo tehnologije sekvenciranja nove generacije (NGS) nudi naš laboratorij možnost sekvenciranja eksoma oz. kritičnih genov tudi v prenatalni diagnostiki. S pomočjo NGS pa nameravamo v bodoče uvesti NIPT.

NIPT je najnovejša metoda odkrivanja plodov z Downovim sindromom in nekaterimi drugimi pogostejšimi kromosomskimi napakami, ki jo lahko opravljamo že od 10. tedna nosečnosti dalje. Gre za neinvaziven, za nosečnico in plod povsem varen ter visoko zanesljiv presejalni test, pri katerem z 98-odstotno zanesljivostjo določimo morebitno trisomijo 21 in nekoliko manjšo zanesljivostjo trisomije kromosomov 18 in 13 ter spolnih kromosomov. Test temelji na analizi DNA v materinem krvnem obtoku s pomočjo metod NGS.

K vsaki prenatalni diagnostiki sodi tudi genetsko svetovanje, ki vključuje razlago izbranih testov ter genetske diagnostike, njihov pomen v primeru pozitivnih in negativnih rezultatov, pomen genetske napake za otroka in družino ter možnosti odločanja v smislu prekinitev nosečnosti.

# Spremljanje zdrave in patološke nosečnosti

**Faris Mujezinović**

UKC Maribor, Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Oddelek za perinatologijo, Maribor, Slovenija

## UVOD

Čeprav je večina nosečnic zdravih, se pri nekaterih med nosečnostjo razvijejo patološka stanja, ki v najhujših oblikah celo ogrozijo življenje tako nosečnice kot njenega otroka. Zdravljenje takšnih stanj je zelo težavno, ker se večinoma razvijajo neopazno. V klinični praksi se ugotavlja šele takrat, ko je prepozno.

Z uvedbo preventivnih pregledov pri ginekologu med nosečnostjo lahko določeno število bolezni ugotovimo že zgodaj in se poveča možnost preprečevanja zapletov.

Ta nabor presejalnih preiskav v nosečnosti imenujemo antenatalno varstvo oziroma vodenje normalne nosečnosti.

V Sloveniji je večina preiskav v sklopu antenatalnega varstva zakonsko opredeljena in se plačuje iz zdravstvenega zavarovanja. Do 20. tedna jih opravljamo na štiri tedne ali šest tednov, do 32. tedna na štiri tedne, do 36. tedna gestacije na dva tedna in od 36. tedna vsak teden.

## PRVO TRIMESEČJE

Kmalu po zanositvi se nosečnica oglasi na prvi pregled pri ginekologu. Na tem pregledu od nje pridobimo družinsko, osebno in ginekološko anamnezo ter podatke o prejšnjih nosečnostih in jih skrbno zabeležimo v materinsko knjižico. Opravimo ultrazvočno preiskavo (UZ), s katero potrdimo prisotnost ploda v maternici, opredelimo število in vitalnost plodov, za izključitev zunajmaternične nosečnosti pa pregledamo, ali se plod razvija v maternici. Na ta način ločimo normalno nosečnost od patološke, kot je spontani splav ali zunajmaternična nosečnost. Določimo krvno skupino, Rh-faktorja, kompletno krvno sliko ter indirektni Coombsov test. Pregledamo urin in nosečnico testiramo na sifilis in toksoplazmozo. Izmerimo ji krvni tlak in ga kontroliramo tudi ob vsakem naslednjem pregledu (1).

Z ultrazvočno meritvijo nuhalne svetline ploda od 11. do 13. 6/7 tedna nosečnosti ocenimo tveganje za kromosomske nepravilnosti. Takrat opravimo pregled zgodnje anatomske ploda. S kombiniranjem meritve nuhalne svetline in dvohormonskega testa dvignemo stopnjo odkrivanja plo-

dov z Downovim sindromom na 95 %. Če smo napačno določili gestacijsko starost, lahko pri biokemičnih testih za odkrivanje plodovih kromosomskih nepravilnosti pričakujemo več lažno pozitivnih rezultatov. Zato je ena od glavnih nalog v zgodnji nosečnosti določitev gestacijske starosti oz. postavljanje zanesljivega datuma poroda. Od tega je odvisno, ali bomo pravočasno našli tiste plodove, ki zaostajajo v rasti, in kako zanesljivo bomo nadzirali tiste nosečnice s poterminsko nosečnostjo. Naegelejeva formula (datum zadnje menstruacije + eno leto – 3 mesece + 7 dni) sloni na datumu zadnje menstruacije, vendar je precej nezanesljiva pri nerednih menstruacijskih ciklih ali ob neustreznih uporabi kontraceptivov.

Odkritje ultrazvoka je omogočilo bolj zanesljivo določanje pričakovanega termina poroda. Dolžina ploda v prvem trimestru je zelo zanesljiv kazalec gestacijske starosti zaradi majhnih normalnih odstopanj od povprečja dolžine za določeno gestacijsko starost (+/- 4 dni) (2, 3). Od 14. do 22. tedna nosečnosti so za določanje gestacijske starosti uporab-

ne tudi meritve premra ter obsega glavice in trebuha (4). Po 22. tednu se razširijo razponi normalnih vrednosti, ki po 30. tednu nihajo celo do tri tedne. Zato je izjemno pomembno določiti gestacijsko starost že v prvem trimesečju.

Do 10. tedna nosečnosti z vaginalnim ultrazvočnim pregledom ocenimo število plodov, velikost gestacijskih vrečk ter srčno aktivnost ploda. Če primerjamo s pregledom skozi trebuhi, omogoča vaginalni pristop boljšo ločljivost slike in za teden dni hitrejšo razpoznavo struktur. Indikacije za ultrazvočni pregled vključujejo: bolečine v spodnjem delu trebuha ali krvavitve iz nožnice, oceno števila, dolžine in vitalnosti ploda, oceno ginekoloških organov, pregled struktur ploda, meritve nuhalne svetline ter opravljanje invazivnih prenatalnih preiskav, kot je horionska biopsija. Izključimo molarne ali ektopične nosečnosti. Odmrte ploda (angl. missed abortion) in krvavitve v nosečnosti so najpogosteje nepravilnosti (5).

Abdominalni pristop, ki ga od 11. tedna pogosteje uporabljamo, omogoča večjo stopnjo fleksibilnosti pri pregledovanju kot vaginalni. Izmerimo razdaljo teme-trtica, ter ocenimo možganske strukture, horoidne pleksuse, nosno kost, želodec, ledvice in mehur. V tem času se vidijo še okončine in prsti na njih.

Pri nuhalni svetlini gre za plast tekočine v podkožju na vratu ploda, ki je v obliki mlade lune. Za pravilno meritve nuhalne svetline je izjemno pomembno, da plod prikažemo v ustreznom vzdolžnem položaju, pri katerem je nuhalna svetlina najdebeljša. Od 11. tednov 0/7 in 13. tednov 6/7 z meritvijo nuhalne svetline ploda izračunamo tveganje za kromosomske nepravilnosti pri plodu, zlasti trisomije 21. Votlina v možganih, imenovana intrakranialna svetlina, je povezana s spinobifidom.

Čeprav je v tem času možno ultrazvočno ocenjevati še druge markerje, kot so nosna kost, trikuspidalna regurgitacija ali pretok skozi venozni duktus, jih je izjemno učinkovit test plodove celično proste DNA v materini krvi za odkrivanje genetskih bolezni pri plodu potisnil v ozadje.

Z meritvijo pretokov skozi arterijo, ki oskrbuje maternico s krvjo (a. uterina), lahko ocenimo tveganje za pojav zgodnje preeklampsije kasneje v nosečnosti ter pravočasno uvedemo aspirin pri tistih s povečanim tveganjem (6).

Pri dvojčkih v prvem trimestru določimo horionost, ker je od tega odvisno nadaljnje vodenje nosečnosti pri dvojčkih (7). Več kot 70 % plodovih nepravilnosti odkrijemo že v prvem trimestru nosečnosti (8).

## DRUGO TRIMESEČJE

Drugo trimeseče se začne v 14. in zaključi v 28. tednu nosečnosti. V 16. tednu skozi trebuhi matere kontroliramo srčne utripe z doplerskim dlančnim aparatom. Nekatere mnogorodnice že takrat čutijo gibe ploda, primipare pa šele v 20. tednu. Začetek čutenja plodovih gibov zabeležimo v materinsko knjižico.

Merimo razdaljo fundus-simfiza, s katero ocenjujemo rast maternice in ploda. To meritve skupaj s kontrolo srčnih utripov ploda opravljamo pri vseh naslednjih pregledih.

Ponovno kontrolo celotne krvne slike opravimo v 22. tednu nosečnosti. Nadziramo raven hemoglobina in trombocitov, v urinu pa prisotnost levkocitov, bakterij in proteinov.

Če nosečnica ni prebolela toksoplazmoze, kar kažejo tudi negativni testi v prvem trimestru, opravimo ponovno kontrolo prisotnosti protiteles v drugem trimestru. Če je no-

sečnica že prebolela toksoplazmozo, nadaljnji kontroli ne potrebuje. Imunost traja vse življenje.

V zadnjih letih obremenitveni test z glukozo opravljamo pri vseh nosečnicah in ne le pri ogroženih skupinah. Nosečnice spijejo 75 g glukoze (75 g OGTT – oralni glukozni tolerančni test). Cilj je odkriti vse nosečnice z gestacijskim diabetesom in pri tistih, ki krvnega sladkorja ne morejo uravnavati samo z dieto, uvesti inzulin.

Nosečnice z dejavniki tveganja za sladkorno bolezen testi opravijo že prej v nosečnosti. Nosečnice, ki imajo na teče krvni sladkor 5,1 mmol/l testa že brez 75 g OGTT, uvrstimo med tiste z gestacijskim diabetesom. Ocenjeno je, da ima gestacijski diabetes 17–20 % nosečnic.

Obdobje od 18. do 22. tedna nosečnosti je primerno za ultrazvočni pregled morfološke strukture ploda. Pregledamo struktu-

ro glavice in hrabenice, prsnega koša, trebuha ter okončin ploda. Določimo položaj ploda in posteljice v maternici in ocenimo količino plodovnice. Izključimo nizko ležečo posteljico ter pri ogroženi skupini nosečnic izmerimo dolžino materničnega vrata.

Aloimunizacijo, ki plod lahko vodi v ascites in smrt, pomembno zmanjšamo z aplikacijo IgG protiteles v obdobju od 26. do 28. tedna nosečnosti in po porodu. Dobijo ga vse Rh negativne nosečnice. V prihodnosti načrtujemo določanje Rh statusa ploda z neinvazivnimi krvnimi testi matere. Rh negativne matere z Rh negativnimi plodovi ne bodo dobole odmerka imunoglobulinov, ker ga ne potrebujejo.

## TRETJE TRIMESEČJE

Laboratorijske preiskave ponovimo v 32. tednu nosečnosti. Mednje uvrščamo kontrolo kompletne krvne slike in določitev HbsAg za izključitev kroničnega hepatitisa B. Sledijo kontrole na dva tedna. Če najdemo odstopanja, pošljemo nosečnico na dodatne ultrazvočne in laboratorijske preiskave. Po 36. tednu nosečnica hodi na tedenske kontrole k svojemu ginekologu, ki ocenjuje rast maternice, krvni tlak in urin nosečnice. CTG preiskava pri manj ogroženih nosečnicah ni učinkovita pri zniževanju plodove umrljivosti.

V tretjem trimesečju želimo še spremljati stopnjo rasti in razvoja ploda. To opravimo z meritvijo razdalje fundus-simfiza (FS). Vsako odstopanje prekontroliramo z ultrazvočno preiskavo. Rutinskega ultrazvočnega merjenja ploda v tretjem trimesečju v Sloveniji ne opravljamo (9–11).

Ocena telesne teže ploda v tretjem trimesečju temelji na matematični formuli, ki vključuje premer glavice, obseg glavice, obseg trebuha in dolžino stegnenice. Ocenjena in resnična teža odstopata v razponu od 8–15 % in ta nenatančnost se stopnjuje do termina (12–14). Manjša rast ploda napoveduje slab neonatalni izid. Pomembno je vedeti tudi, na kateri centili normalnega razpona se plod nahaja in kako se ta položaj v normalnem razponu spreminja med nosečnostjo. Možno je, da celo tisti plodovi, pri katerih je teža ves čas v normalnem razponu, vendar na začetku nosečnosti na višjih, kasneje pa na nižjih centilih, zaostajajo v rasti.

Ultrazvočna ocena velikega ploda v terminu slabo napoveduje dogodek med porodom, zato je v klinični praksi ne uporabljamo za napoved distocije ramen in poškodbe živcev roke (15).

## POTERMINSKA NOSEČNOST

Čeprav je po definiciji normalen porod tisti, do katerega pride od 37. do 42. tedna gestacije, nosečnost, ki poteka čez pričakovani termin poroda, imenujemo poterminska nosečnost.

Poterminsko nosečnost nadziramo z ultrazvočno oceno količine plodovnice, ki odraža funkcijo posteljice, ter s preiskavami CTG. Doplersko merjenje pretokov skozi popkovnič-

no arterijo je na žalost neuporabna metoda za ugotavljanje ogroženosti ploda v tem času.

Če do poroda ne pride do 41. tedna nosečnosti, ga lahko sprožimo s prostaglandini ali pa čakamo do 42. tedna, vmes pa spremljamo stanje ploda.

## ZAKLJUČEK

Antenatalno varstvo je v zadnjih 100 letih prineslo ogromen napredok in dramatičen padec maternalne in perinatalne umrljivosti. Uvedba rednih presejalnih pregledov med no-

sečnostjo predstavlja temelj zdravja in jih je treba v prihodnosti tudi naprej razvijati.

Nova odkritja in preiskave z večjo močjo odkrivanja patoloških stanj z malim številom lažno pozitivnih rezulta-

tov je treba čim prej in finančno optimalno uvesti v že obstoječi sistem.

## LITERATURA

1. Uradni list RS 19 – 1998. Dostopno: <http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=199819&stevilka=807>. Pridobljeno: 25. 5. 2018.
2. Pedersen NG, Figueras F, Wojdemann KR, Tabor A, Gardosi J. Early fetal size and growth as predictors of adverse outcome. *Obstet Gynecol* 2008; 112: 765–71.
3. Ioannou C, Talbot K, Ohuma E, Sarris I, Villar J, Conde-Agudelo A, Papageorgiou AT. Systematic review of methodology used in ultrasound studies aimed at creating charts of fetal size. *BJOG* 2012; 119: 1425–39.
4. Degani S. Fetal biometry: clinical, pathological, and technical considerations. *Obstet Gynecol Surv* 2001; 56: 159–67.
5. Perriera L, Reeves MF. Ultrasound criteria for diagnosis of early pregnancy failure and ectopic pregnancy. *Semin Reprod Med* 2008; 26: 373–82.
6. Nicolaides KH. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 45–67.
7. Hack KE, Derkx JB, Elias SG, Franx A, Roos EJ, Voerman SK, Bode CL, Koopman-Esseboom C, Visser GH. Increased perinatal mortality and morbidity in monochorionic versus dichorionic twin pregnancies: clinical implications of a large Dutch cohort study. *BJOG* 2008; 115: 58–67.
8. Blaas HG. Detection of structural abnormalities in the first trimester using ultrasound. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2014; 28: 341–53.
9. Pearce JM, Campbell S. A comparison of symphysis-fundal height and ultrasound as screening tests for light-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1987; 94: 100–4.
10. Bais JM, Eskes M, Pel M, Bonsel GJ, Bleker OP. Effectiveness of detection of intrauterine growth retardation by abdominal palpation as screening test in a low risk population: an observational study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 116: 164–9.
11. Harding K, Evans S, Newnham J. Screening for the small fetus: a study of the relative efficacies of ultrasound biometry and symphysifundal height. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1995; 35: 160–4.
12. Nyberg DA, Abuhamad A, Ville Y. Ultrasound assessment of abnormal fetal growth. *Semin Perinatol* 2004; 28: 3–22.
13. Benavides-Serralde A, Hernandez-Andrade E, Fernandez-Lara A, Figueras F, Moreno-Álvarez O, Camargo-Marín L, Acevedo-Gallegos S, Gallardo-Gaona J, Velázquez-Torres B, Guzmán-Huerta M. Accuracy of different equations for estimating fetal weight. *Gynecol Obstet Invest* 2011; 72: 264–8.
14. Baum JD, Gussman D, Wirth JC 3rd. Clinical and patient estimation of fetal weight vs. ultrasound estimation. *J Reprod Med* 2002; 47: 194–8.
15. Gonen R, Spiegel D, Abend M. Is macrosomia predictable, and are shoulder dystocia and birth trauma preventable? *Obstet Gynecol* 1996; 88: 526–9.



# 05 | POCT včeraj, danes, jutri

# Dejavnost POCT včeraj, danes, jutri

**Danijela Furlan, Petra Malavašič**

Splošna bolnišnica Novo mesto, Diagnostični laboratorij, Novo mesto, Slovenija

## UVOD

Laboratorijska medicina je v sunkovitem razvojnem zagonu, pri katerem opazimo dva nasprotajoča trenda, od automatizacije celotnih laboratorijev do aplikacij za testiranje ob pacientu (1). Diagnostične tehnike so zaradi hitrega napredka tehnologije postale cenejše, bolj zanesljive in hitrejše. Napredek je omogočil, da se je laboratorijsko testiranje pomaknilo tudi bližje pacientu.

V zgodovini so čisto prve diagnostične teste opravljali ob postelji pacienta in so vključevali pretežno preiskave urina. Leta 1850 je Jules Maumene prvič razvil enostavne testne lističe iz ovje volne in natrijevega klorida za obposteljno določanje sladkorja v urinu, nato pa je leta 1908 Stanley Benedict vpeljal naprednejšo metodo določanja z bakrovim reagentom. Ta princip se je obdržal do leta 1965, ko so razvili prve testne lističe z encimom glukozo oksidazo. Prvi analizator (aparat), ki je deloval na encimskem principu in je podal kvantitativen rezultat, je prišel v bolnišnice in urgentne centre leta 1970 (2). V naslednjih letih pa je večinoma prevladovala laboratorijska diagnostika v centralnih laboratorijih. V novejšem času se z naprednim tehnološkim razvojem diagnostični testi vračajo ob postelje bolnikov (3). Medicinska dejavnost POCT je leta 1988 obsegala 8 testov, dvajset let kasneje pa jih je bilo v uporabi že več kot 100 za določanje različnih bioloških analitov (4). Prvi POCT ana-

lizatorji so bili razviti za hitro odkrivanje najbolj ogroženih bolnikov. Omogočali so plinsko analizo arterijske krvi, merjenje elektrolitov in določanje krvnega sladkorja (5). To so bili ročni analizatorji brez možnosti kalibracij in drugih kontrolnih postopkov (6). Danes je POCT del laboratorijske dejavnosti, za katero veljajo enake zahteve kakovosti kot za medicinske laboratorije. Novejši POCT aparati so prenosljivi, lahki in enostavni za uporabo ter v kratkem času opravijo kompleksne biološke teste (7). POCT analizatorji obstajajo v dveh formatih: "obposteljni" in "blizuposteljni". Obposteljni so manjši, ročni aparati in njihov prenos je enostaven. Navadno lahko z njimi določamo en biološki parameter. Blizuposteljni analizatorji so večji, stacionarni in z njimi lahko določamo več analitov hkrati (8). V laboratorijski diagnostiki ima POCT dejavnost najvišjo letno rast (10 %) in na svetu je več kot 100 podjetij, ki razvijajo nove POCT aparate (1). Največji delež POCT dejavnosti obsegajo aparati za določanje glukoze. Redno kontroliranje krvnega sladkorja diabetičnih bolnikov je učinkovito zmanjšalo številne zaplete sladkorne bolezni (4). Od leta 1998 se določanje glukoze s POCT aparati šteje kot sestavni del zdravljenja sladkorne bolezni. Obvezno pa je tudi spremljanje glikirane hemoglobine (HbA1c), predvsem pri zdravljenju diabetesa tipa II (9).

## RAZVOJ POCT V PRETEKLOSTI

### Glukometri

Mineva več kot 40 let od začetkov razvoja POCT glukoznih meritnikov. Prvi so bili testni lističi, ki so vsebovali membrano, da je zadržala krvne celice in encima glukozo oksidazo ter peroksidazo. Ob prisotnosti glukoze je potekla barvna reakcija in glede na priloženo barvno lestvico

so vizualno odčitali koncentracijo glukoze. Za potek analize je bila potrebna velika kaplja krvi ( $\sim 100 \mu\text{L}$ ). Meritev je trajala eno minuto, nato pa je bilo treba za odčitavanje rezultata kapljo krvi popivnati oziroma odstraniti z lističa. Anton Clemens je nato združil metodi Dextrostixa in reflektometrije (Ames Reflectance Meter; ARM) v kvantitativni glukozni meritnik, primeren za urgentno in ambu-

lantno obravnavo pacientov. Vrednosti so bile le v normalnem območju primerljive s tistimi, dobljenimi po referenčni metodi. Slabost je bila tudi v tem, da je za delovanje potreboval veliko baterij, kar je naredilo aparatu težak in zato je bila njegova prenosljivost otežena. Kmalu zatem je japonsko podjetje razvilo aparat, ki je imel enak princip merjenja, toda z električnim virom napajanja. Taki analizatorji so bili zato veliko lažji in manjši. Leta 1974 je prišel v uporabo analizator, ki je potreboval za analizo veliko manjšo količino krvi ( $\sim 30 \mu\text{L}$ ) in tako se je prvič pojavila ideja, da bi si lahko pacienti sami doma merili raven sladkorja. 1981 je Ames Division predstavil Glukometer I. Ta je bil digitalen, majhen, lahek, prenosljiv in enostaven za uporabo, z vgrajeno avtomatsko kalibracijo, toda še vedno je reakcija potekala na Dexstrostixu. Izpopolnjene testne lističe so razvili 1986 in tako je nastal Glukometer II. Leta 1990 je sledil Glukometer GX, ki je omogočal shranjevanje rezultatov, in do takrat je bil to najmanjši analizator na trgu. Leta 1984 je podjetje Boehringer Mannheim (BM) predstavilo prvo serijo aparatov Accu-Chek. Ti so do tedaj dosegli najboljšo primerljivost z referenčno heksokinazno metodo (9). Leta 1993 je podjetje Bayer razvilo elektrodni biosenzor s kapilarnim vlekom krvi, zato ni bilo treba več odstranjevati odvečne krvi. Za meritev je potreboval le  $5 \mu\text{L}$  kapilarne krvi. Leta 1996 je tudi podjetje Roche prvič uvedlo v svoje aparate biosenzorje za določanje krvnega sladkorja. Imenovali so se Accu-Chek Advantage in so vsebovali encim glutamat dehidrogenazo (GDH) in koencim pirolokinolin kinon (PQQ). S tem se je povečala občutljivost metode, toda visoka koncentracija maltoze in galaktoze je dajala lažno zvišane rezultate (9).

Podjetje Bayer je leta 2003 poslalo na tržišče The Assensia Breeze glukometer z avtokalibracijo, ki je potreboval le 2–3  $\mu\text{L}$  kapilarne krvi. Najpopularnejši Bayerjev glukozni merilnik je bil Ascensia Contour, ki je podal rezultat v 15 sekundah in potreboval le  $0,6 \mu\text{L}$  krvi za analizo. Zanesljive rezultate je podajal v širokem merilnem območju. Danes na trgu večinoma prevladujejo glukometri, ki delujejo na principu elektrodnega biosenzorja in potrebujejo le 0,3–1  $\mu\text{L}$  kapilarne krvi (9).

## Koagulometri

Test za spremljanje motenj v strjevanju krvi je uvedel že Kitajec Huang Ti pred 3000 leti. S tem testom je določil čas, potreben za prenehanje iztekanja krvi iz namerno povzro-

čene rane. Tak način določanja hemostaze se je ohranil vse do 19. stoletja, ko so odkrili, da je proces strjevanja krvi sestavljen iz verige zaporednih biokemičnih reakcij, pri katerih sodelujejo faktorji strjevanja krvi. Razumevanje tega principa je vodilo do razvoja prvih analizatorjev za določanje časa strjevanja krvi (10). Test merjenja tega časa je na začetku temeljal na vizualni oceni nastanka strdka. Kasneje so sledili testi, ki so ob nastanku strdka zaznali spremembo v viskoznosti. Z razvojem fotometričnih metod se je pričel določati čas do nastanka strdka po principu turbidimetrije in nefelometrije. Prvi POCT koagulometri so bili enostavnii za uporabo, toda vedno veliki in stacionarni. Do leta 1950 je bilo antikoagulantno zdravljenje možno le v bolnišnici. Potekalo je parenteralno z zdravilom heparin. Zato je kasneje uvedba varfarina v obliki tablet olajšala in omogočila kontinuirano zdravljenje. Problem zdravljenja z varfarinom je, da ima ta ozko terapevtsko okno, zato je nujno sprotno in pogosto preverjanje časa strjevanja krvi (10). Leta 1990 je podjetje Boehringer Mannheim predstavilo POCT na pravo CoaguChek® za določanje PČ. Aparat je vseboval ploščice za enkratno uporabo s tromboplastinskim reagentom. Ploščica je vsebovala še drobne železove opilke, ki so se premikali ob delovanju elektromagnetnega polja. Za potek analize je zadostovala kaplja kapilarne krvi. Ob nastanku strdka so se železovi opilki ustavili in čas je bil določen optično. Naprava je podala tudi INR indeks, s čimer je bila zagotovljena standardizacija rezultatov PČ med različnimi analizatorji. V uporabi so bile takrat tudi naprave z mehanskim principom detekcije. Primer je Coag-Sense™ PT/INR monitoring system (CoaguSense Inc., USA). Testna ploščica za enkratno uporabo je imela vrtljivo kolesce, ki je zajelo vzorec krvi in ga pripeljalo do reagenčne posodice, kjer je reagiral z rekombinantnim zajčjim tromboplastinom. Skozi reagenčno posodico je svetil IR žarek in ob nastanku strdka se je ta prekinil. Merjen je bil čas (PČ) od začetka reakcije do prekinitve IR žarka. Čeprav je podajal zanesljive rezultate, je bil vseeno težak za prenašanje, zato se je uporabljal kot stacionarni analizator (10). Danes so na voljo majhni, prenosni aparati, ki delujejo na principu elektrokemičnih senzorjev (Coagu-Chek XS in iSTAT) in se uporabljajo tako v bolnišnicah kot tudi za samokontrolo.

## ZAKLJUČEK

Dejavnost POCT je najhitreje rastoči segment v laboratorijski diagnostiki, danes vreden 28 milijard dolarjev. POCT omogoča hitro diagnozo in takojšnje ukrepanje. Dodatno je z uvedbo POCT omogočena zdravstvena obravnava tudi na področjih brez ustrezne laboratorijske opreme. Še vedno pa ima nekatere omejitve, predvsem so to interferenčni dejavniki, ki vplivajo na pravilen rezultat. Upoštevanje

pravil in spremljanje smernic je nujno za standardizacijo metod, platform in procesov v POCT dejavnosti. Osredotočenost obposteljne diagnostike ne sme biti le v razvoju novih POCT aparativov, ampak predvsem v pripravi poenotnih praktičnih napotkov in navodil za delavce, ki opravljajo meritve (11). Prihodnost POCT je predvsem v detekciji večjih analitov na mikročipu iz ene kapljice krvi (12).

## LITERATURA

1. Warshinck A. Point of Care Testing of Proteins. *Anal Bioanal Chem.* 2009;393:1393-1405.
2. Rajendran R, Rayman G. Point of care blood glucose testing for diabetes care in hospitalized patients: an evidence based review. *JDST.* 2016;8:1081-1090.
3. Price CP. Point of care testing. *Clin rev.* 2001;322:1285-1288.
4. Wagar EA, B. Yasin B, S. Yuan S. Point of Care Testing: Twenty Years Experienc. *Labmed.* 2008;39:560-563.
5. Clerc O, Greub G. Routine use of point of care tests: usefulness and application in clinical microbiology. *Clin Micro Inf.* 2010;16:1054-1061.
6. Camacho-Ryan O, Bertholf RL. Monitoring point of care testing compliance. *Clin lab news.* 2016. Dosegljivo na: <https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2016/february/monitoring-point-of-care-testing-compliance>.
7. Futrell K. Laboratory point of care testing: a future outlook, Orchard Software; 2015.
8. Larsson A, Greig-Pylypczuk R, Huisman A. The state of point of care testing : a european perspective. *Upsala J Med Sci.* 2015; 120: 1-10.
9. Clarke SF, Foster JR. A history of blood glucose meters and their role in self-monitoring of diabetes mellitus. *Brit J Biomed Sci.* 2012;69:83-93.
10. Harris LF, Castro-Lopez V, Killard TJ. Coagulation monitoring devices: Past, Present and Future at the point of care. Dublin institute of technology. 2013. Dosegljivo na: <https://arrow.dit.ie/cgi/viewcontent.cgi?referer=https://www.bing.com/&httpsredir=1&article=1153&context=scschbioart>.
11. Kahn SE. Point of Care Testing in the 21st Century: Yesterday, Today, Tomorrow. *Point Care.* 2016; 15: 176-179.
12. Le RD, Ida M, Stacy EF. What is New in Point-of-Care testing? *Point Care.* 2016;15:158-163.

# POCT v splošni bolnišnici Novo mesto

**Tadeja Dežman**

Splošna bolnišnica Novo mesto, Diagnostični laboratorij, Novo mesto, Slovenija

## UVOD

Rezultati preiskav ob pacientu (POCT) vodijo v klinične odločitve zdravnikov. Da je zagotovljena varnost pacientov, mora biti v zdravstveni ustanovi POCT pravilno implementiran in nadzorovan (1). Pred leti so se zdravniki v naši bolnišnici po obisku prodajalcev POCT opreme sami odločili za nakup in odredili opravljanje testov brez vedenosti laboratorija. Ob pobudi predstojnice laboratorija smo ustanovili interdisciplinarno koordinacijsko skupino (poslovna direktorica, strokovni direktor, pomočnica direktorice za zdravstveno nego, predstojnica laboratorija), na strokovnih kollegijih predstavili pravilno pot vpeljave POCT in naredili obhod po bolnišnici, da smo dobili pregled nad POCT te-

sti, ki so jih opravljali. Ko zdaj zdravniki izrazijo željo za opravljanje preiskave ob pacientu, koordinacijska skupina presodi, ali je POCT ustrezna rešitev in preiskavo odobri ali zavrne. Vpeljavo preiskave koordinira Diagnostični laboratorij Splošne bolnišnice Novo mesto. Pri organizaciji in nadzoru nad POCT upoštevamo Priporočila za organiziranje in izvajanje laboratorijskih testov ob pacientu, ki jih je pripravilo Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (2). Danes ob pacientu opravljamo meritve glukoze, pH-ja popkovnične krvi, elektrolitov, protrombinskega časa, glikiranega hemoglobina in CRP-ja.

## POCT GLUKOZA

V bolnišnici smo do junija 2016 za merjenje glukoze ob pacientu uporabljali merilnike za samokontrolo Accu-Chek AVIVA. V skladu z zakonskimi predpisi (Zakon o medicinskih pripomočkih, UL RS 98/09) in pravilnikom (6. člen Pravilnika o delu medicinskih laboratorijev, UL RS 64/2004) smo se odločili, da merilnike zamenjamo s profesionalnimi aparati za merjenje POCT glukoze. Na javnem razpisu so bili izbrani glukometri Accu-Chek Inform II (ACII), proizvajalca Roche, ki se lahko povežejo v program za nadzor cobas IT 1000.

Za evalvacijo smo na aparatu ACII analizirali 50 vzorcev polne krvi (EDTA), jih takoj po analizi centrifugirali, plazmo odpipetirali in sekundarno epruveto in koncentracijo glukoze izmerili še na biokemičnem analizatorju (referenčna metoda) (3, 4). Na podlagi števila izdanih škatlic in beleženja porabe testnih lističev po posameznih oddelkih, smo v dogovoru z glavno sestro določili 18 lokacij za ACII (prej 45 merilnikov AVIVA). Sledila je postavitev aparatov in povezava v program cobas IT 1000. Po opravljenem izobraževanju je podjetje Roche izdalo potrdilo o usposobljenosti

(certifikat) POCT koordinatorjem iz laboratorija. Pripravili smo potrebno dokumentacijo (SOP), za uporabnike tudi kratka navodila za delo s slikovnimi prikazi in obvestilo s pomembnimi informacijami o rokovovanju s testnimi lističi in kontrolnimi raztopinami. Izobraževanja za uporabnike (srednje in diplomirane medicinske sestre) sta izvajali predstavnica podjetja in pooblaščena oseba iz laboratorija. Obsegalo je vse tri faze testnega postopka. Poudarek je bil na rokovovanju z aparatom, ki zahteva prijavo uporabnika s svojo kodo, skeniranje črtne kode pacienta in izbiro ustreznegra LOT-a kontrol in testnih lističev. Podjetje je uporabnikom izdalо certifikat o usposobljenosti za dobo dveh let. Sestre so izrazile nezadovoljstvo zaradi menjave glukometrov, saj so bile navajene starih merilnikov in jim je bilo učenje rokovovanja z novimi aparati odveč.

Zamenjava glukometrov in uvedba sistema IT 1000 sta laboratoriju olajšali nadzor nad POCT glukozo. Vsak trenutek lahko preverimo status aparatov, v program se prenesejo napake, ki se pojavljajo na aparatih. Mogoča je sledljivost

LOT-ov testnih lističev in kontrolnih raztopin. Program olajša obvladovanje velikega števila uporabnikov in omogoča, da glukozo merijo le usposobljeni uporabniki (5). Glavne sestre obvestijo laboratorij o novih uporabnikih, ki potrebujejo dovoljenje za delo z ACII. Za te POCT koordinator pripravi individualno izobraževanje, jih vnese v sistem in jim izda interno potrdilo o usposobljenosti za delo z aparatom. POCT glukozo pacientom merijo tudi dijaki in študentje, zato vsi pred prvim rokovanjem z aparatom opravijo izobraževanje, za prijavo v ACII pa uporabljajo enotno kodo. Na začetku smo proizvajalcu za vnos v IT 1000 posredovali podatke za 550 uporabnikov, ki jim je v letošnjem letu potekla veljavnost certifikata. Za podaljšanje so analizirali kontrolni vzorec. Uporabnike, ki meritve dalj časa niso opravljali, smo deaktivirali. S časom znanje in veščine bledijo, zato uporabniki, ki meritve opravljajo le občasno, potrebujejo večji nadzor, da je zagotovljena varnost pacientov (točen rezultat). Trenutno imamo aktivnih 267 uporabnikov.

Za notranjo kontrolo kakovosti uporabljamo priporočene kontrolne raztopine proizvajalca v dveh koncentracijskih območjih. Vsak dan na vsakem aparatu uporabniki analizirajo en nivo kontrolne raztopine. Aparat ne dovoli meritve pri pacientu, če kontrola ni narejena v roku 24 ur in kadar kontrola pade izven dovoljenega območja odstopanja. Rezultati kontrol se prenesejo v IT 1000. V laboratoriju jih dnevno pregledamo. Če kontrola na določenem aparatu pade izven dovoljenega območja, pri uporabniku opravimo nadzor. Preverimo upoštevanje priporočil proizvajalca o rokovaju z aparatom, testnimi lističi in kontrolnimi raztopinami. Pripravljen imamo obrazec, ki ga skupaj z uporabnikom izpolnimo, podpišemo in hranimo v laboratoriju. Uporabniki najpogosteje zamenjajo kontrolne stekleničke – nanesejo napačni nivo kontrole, izberejo napačni LOT kontrole ali testnih lističev, kontrolne raztopine uporabljajo več kot tri mesece (po odprtju so stabilne največ tri mesece) in ne zabeležijo datuma odprtja. Pri nadzorih pa smo našli tudi odprto posodico s testnimi lističi, posodico z odlomljenim pokrovčkom, testne listice natresene na plad-

nju in prijavo zaposlenega uporabnika pod kodo *dijak študent*. Vsak obisk na lokaciji izkoristimo za izobraževanje in jih opozarjam na ustrezno rokovanje s testnimi lističi.

Za zunanjocenoceno kakovosti enkrat tedensko v laboratoriju pripravimo "pool" serum in alikvote pošljemo na lokacije, kjer so aparati ACII. Uporabniki vzorec analizirajo kot test pacienta, pod kodo, ki smo jo pripravili za tedensko kontrolo. Rezultate iz programa IT 1000 prenesemo v tabelo in prikažemo grafično (dovoljeno je 15-odstotno odstopanje od koncentracije, izmerjene na biokemičnem analizatorju). Z aparati ACII smo vključeni v republiško kontrolo SNEQAS POCT. Predstojnica laboratorija dvakrat letno na sestrskem sestanku uporabnike seznaní z rezultati zunanjocenoceno kakovosti.

Urediti moramo še prenos rezultatov v HIS (Birpis), saj medicinske sestre rezultate meritve pri pacientih še vedno beležijo na liste slatkornih bolnikov. S prehodom na profesionalne glukometre je viden tudi finančni prihranek.

### **POCT pH popkovnične krvi novorojenčkov**

Leta 2017 smo imeli v bolnišnici 1221 porodov. V porodni sobi medicinske sestre merijo pH popkovnične krvi novorojenčkov na POCT plinskem analizatorju ABL80 FLEX, Radiometer. Za menjavo kasete (pretočna celica z elektrodam) in kompleta tekočin (za kalibracijo in kontrolo kakovosti) skrbi laboratorij, ki vodi evidenco porabe in serijskih številk. Kontrola kakovosti se analizira samodejno v nastavljenih intervalih. Če kontrola pade izven dovoljenega območja odstopanja, določenega od proizvajalca, meritve vzorcev niso možne. Enkrat tedensko analiziramo naključni vzorec polne krvi na plinskem analizatorju v laboratoriju in v porodni sobi (analizo izvede laboratorijski strokovnjak). Rezultate zabeležimo v tabelo, izračunamo procent odstopanja in prikažemo grafično (dovoljeno je ± 1-odstotno odstopanje med rezultatoma – mejo smo določili sami, ker ni predpisana drugače).

## **POCT ELEKTROLITI (iCa, K, Na)**

Na oddelku za dializo medicinske sestre merijo elektrolite v plazmi dializnih bolnikov na POCT analizatorju 9180 Electrolyte Analyzer, Roche. Vzorce krvi (Li-heparin) pred analizo centrifugirajo. Povprečno na mesec analizirajo 450

do 500 vzorcev. Uporabniki so zadolženi za vsakodnevno vzdrževanje analizatorja in analiziranje notranje kontrole kakovosti. Rezultate kontrol vpisujejo v pripravljen obrazec. Če kontrola pade izven dovoljenega območja odstopanja,

obvestijo laboratorij. Enkrat tedensko analizirajo naključni vzorec pacienta ter ga pošljejo v laboratorij, kjer ga analiziramo na enakem analizatorju. Rezultate vpišemo v tabelo, izračunamo odstotek odstopanja in prikažemo grafično (dovoljeno je  $\pm 1$ -odstotno odstopanje). Uporabniki analizirajo tudi kontrolo RIQAS (Clinical Chemistry), vzorec jim pošljemo iz laboratorija in rezultate primerjamo s srednjim vrednostjo po vrnjenem poročilu v biokemični laboratoriji.

“POCT” protrombinski čas (PČ/INR) in “POCT” glikirani hemoglobin (HbA1c)

Meritve protrombinskega časa v antikoagulantni ambulanti in glikiranega hemoglobina v ambulanti za diabetes opravlja laboratorijski strokovnjak, zato to nista pravi POCT preiskavi. Imata pa dodano vrednost, ker meritve opravimo neposredno ob pacientu in so rezultati zdravniku za terapevtsko odločitev na razpolago takoj.

## POCT CRP

V bolnišnici še nismo povsem uspešni pri upoštevanju organizacijskega predpisa o obvladovanju POCT področja. Pred slabim letom je glavna sestra urgentnega centra obvestila predstojnico laboratorija, da na zahtevo zdravnikov v ambulanti merijo CRP na dveh manjših aparatih. Obvestili smo člane koordinacijske skupine, evalvirali aparat in

se dogovorili za priklop v program za nadzor, ki pa zaradi nepredvidenih težav pri povezavi še do danes ni vzpostavljen. Proizvajalec še ni opravil izobraževanj uporabnikov in izdal certifikatov, kontrole vpisujejo na list. Do pravilne implementacije bo tako poteklo še nekaj časa.

## ZAKLJUČEK

Po odločitvi za POCT sledi vpeljava v prakso, ki poteka v več fazah: (1) izbira aparata, (2) verifikacija aparata, (3) priprava dokumentacije, (4) postavitev, priklop, konfiguracija aparata, (5) izobraževanje uporabnikov, (6) nadzor nad izvajanjem POCT (6). Povezava aparatov v program za nadzor omogoča sledljivost in nadzor nad uporabniki, kontrolo kakovosti, reagentov, aparatov (5). V prihodno-

sti si želimo izpeljati povezavo IT 1000 – HIS (Birpis) in v program za nadzor povezati še druge POCT aparate. Izziv nam predstavlja izobraževanje velikega števila uporabnikov, zato razmišljamo o programu za spletno učenje rokovovanja s POCT aparati (primerno za osvežitev znanja, vedno na voljo – dostop do računalnika) (1, 6).

## LITERATURA

- Shaw Julie LV. Practical challenges related to point of care testing. *Practical Laboratory Medicine* 4 (2016): 22-29.
- Prezelj M, Bratož S. Priporočila za organiziranje in izvajanje laboratorijskih testov ob pacientu (POCT – Point of Care Testing). SZKK, Ljubljana, 2014.
- Hospital blood glucose testing. Guide for implementation, Roche.
- Accu-Chek Inform II. Blood glucose monitoring system. Operators Manual, Version 5.0, Roche.
- Cobas IT 1000 application – Instruction for Use 4.1, Roche.
- POC Coordinator Workshop Milan 2017, Roche.

# POCT danes v primarnem zdravstvu Dolenjske in Bele krajine

**Marjanca Doltar**

Zdravstveni dom Črnomelj, Laboratoriј, Črnomelj, Slovenija

## UVOD

POCT (point of care testing) je testiranje, ki ga opravljamo ob bolniku ali v bližini bolnika, običajno izven centralnega laboratorija, kjer ga opravlja medicinsko osebje. Analiziramo biološki material, zato veljajo za POCT testiranje iste zahteve kakovosti, kot za medicinske laboratorije (1).

Kakovost na področju POCT določa Mednarodni standard za področje testiranja ob pacientu (POCT) ISO 22870: Point of care testing – Requirements for quality and competence, ki se uporablja v povezavi s standardom, ki velja za medicinske laboratorije, ISO 15189:2013 – Medical laboratories – Requirements for quality and competence in v Sloveniji Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine (UL št. 64/11.6.2004), II poglavje, 6. člen (1, 2, 3).

V zdravstvenih domovih Bele krajine (Črnomelj, Metlika) in Dolenjske (Novo mesto, Trebnje) je za uvajanje in nadzor POCT odgovoren vodja laboratorija – specialist medicinske biokemije. Imenovano imamo interdisciplinarno komisijo za organizacijo POCT, ki jo sestavlja vodja laboratorija, vodje ambulant, glavna medicinska sestra ter predstavniki medicinskega osebja, ki opravljajo teste. Vodimo evidenco vseh aparatov za POCT v ustanovi in imamo vzpostavljen sistem kakovosti.

Za izvajalce POCT so organizirana izobraževanja s strani strokovnih predstavnikov proizvajalca aparatov in interna izobraževanja, ki jih izvaja vodja laboratorija.

## POCT KOAGULOMETRI

V ZD Črnomelj in ZD Novo mesto trikrat tedensko deluje antikoagulantna ambulanta. Za potrebe antikoagulantne obravnave pacientov imamo v ZD Črnomelj 12 POCT

Za posamezno preiskavo smo izdelali standardne operativne postopke (SOP), navodila za delo z aparati in dokumente kontrole kakovosti. V teh dokumentih so podana natančna navodila za izvajanje kontrole kakovosti. Zagotavljamo jo z notranjimi in zunanjimi kontrolami. Navodilo določa obvezna ravnanja oseb, ki so odgovorne za delo z aparatom in se nanaša na izvajanje notranje kontrole, s katero se preverja ustreznost aparata in reagentov, ter zunanjo kontrolo (medlaboratorijsko preverjanje) (1, 2, 3).

Rezultate meritev notranjih kontrol izvajalci vpisujejo v pripravljene tabele in jih konec meseca oddajo vodji laboratorija, ki jih pregleda in statistično obdela ter v primeru neustreznih vrednosti zapiše korektivne ukrepe. V primeru vsakega odstopanja kontrol od priporočenih vrednosti ali težav z aparatom, je izvajalec POCT testov dolžan obvestiti vodjo laboratorija in se posvetovati z njim. Rezultati kontrol so hranjeni v laboratoriju in nato arhivirani po priporočenih dobah arhiviranja.

V zdravstvenih domovih največji delež POCT aparatov predstavljajo PČ/INR aparati za potrebe antikoagulantne ambulante (AKA) ter glukometri v urgentnih ambulantah in patronažnih službah.

aparatov, v ZD Novo mesto pa 29 aparatov. Meritve INR v AKA opravlja medicinsko osebje, na terenu pa patro-nažna služba.

Na podlagi rezultatov meritve INR je bolnikom predpisano antikoagulantno zdravljenje, zato je nujno potrebno zagotoviti pravilen rezultat za pravega pacienta. Notranjo kontrolo kakovosti izvajajo izvajalci preiskav (medicinsko osebje) s komercialnimi kontrolnimi vzorci, ki so predpisani za aparat, in sicer pred rutinskim delom, ob vsaki menjavi lota reagentnih lističev, in če rezultat odstopa glede na kli-

nično sliko. Kontrola z matičnim laboratorijem se izvaja enkrat mesečno, z vzorci naključno izbranega preiskovanca. Preiskovancu opravimo meritve s POCT aparatom in hkrati odvzamemo vensko kri za analizo INR, ki jo opravimo v laboratoriju po standardni metodi. Sedaj smo se s POCT INR vključili še v zunanjoceno kakovosti in prvi vzorec bomo analizirali v mesecu novembra 2018.

## POCT GLUKOMETRI

Uporabniki glukometrov v primarnem zdravstvu Dolenjske in Bele krajine so medicinsko osebje v urgentnih ambulantah in urgentnih avtomobilih ter patronažna služba. V ZD Metlika v laboratoriju ne opravljajo biokemičnih preiskav, POCT aparat za določanje glukoze v krvi uporablja, če naročnik želi to preiskavo kot nujno. Laboratorijsko osebje v omenjenem ZD-ju dobro sodeluje s pacienti, ki glukometre uporablajo doma za samokontrolo. "Urejeni" diabetiki že sami ugotovijo neobičajne rezultate pri dnevnom preverjanju, zato pridejo v laboratorij preverit ustreznost delovanja svojega merilnika.

Na POCT aparatih notranjo kontrolo kakovosti izvajamo s priporočenimi komercialnimi kontrolnimi vzorci in periodično tudi primerjavo z vzorci, pripravljenimi v laboratoriju, zunanjoceno kakovosti pa s sodelovanjem v kontrolni shemi SNEQAS.

Kljub organiziranim izobraževanjem za izvajalce preiskav in napisanim navodilom za delo in vzdrževanje aparativ, se ti predvsem na terenu pogosto srečujejo s težavami, kot so pravilno rokovanje z aparati, čiščenje in razkuževanje aparativov, menjava baterij, shranjevanje aparativov in testnih lističev pri primerni temperaturi.

## ZAKLJUČEK

Rezultati testov POCT vplivajo na nadaljnji potek zdravljenja pacientov, zato je nujno potrebno zagotoviti pravi rezultat z upoštevanjem vseh navodil, priporočil in standarov, ki veljajo na tem področju (4, 5).

V prihodnosti si želimo, da bi se vse meritve POCT testov in kontrol beležile v Laboratorijski informacijski sistem (LIS), kar nam bi omogočalo sledljivost, ambulantam pa sprotno beleženje in shranjevanje rezultatov POCT meritvev.

## LITERATURA

- Prezelj M, Bratož S. Priporočila za organiziranje in izvajanje laboratorijskih testov ob pacientu (POCT- Point of Care Testing). SZKKLM, Ljubljana 2014.
- Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za dovoljenje za delo na področju laboratorijske medicine. Ur.l.64/04
- Meško Brguljan P, Bratož S. POCT testiranje ob pacientu, Seminar za inženirje in tehnike laboratorijske medicine. Zbornik 2014
- Briggs C, Guthrie D, Hyde K, Mackie I, Parker N, Popek M, et al. British Committee for Standards in Haematology General Haematology Task Force Guidelines for point-of-care testing: haematology . Br J Haematol. 2008;142:904–15. [PubMed]
- Shaw Julie LV, Practical challenges related to point of care testing. Practical Laboratory Medicine 4 (2016):22-29

# POCT včeraj, danes, jutri – zakoni, standardi, priporočila

**Saša Bratož**

UKC Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Ljubljana, Slovenija

Testiranje ob pacientu je najstarejša oblika laboratorijske diagnostike. Prvi zapisi o dokazovanju nosečnosti segajo v čas starega Egipta. Skozi stoletja je bil urin kot matriks ključni laboratorijski vzorec. Že Teophilus je uvedel prve analitske tehnike, Gilles de Corbeil v 12. stoletju napiše "Liber de urinis", ki jo lahko pojmemojemo za prve smernice kakovostnega dela. V 19. stoletju se diagnostika začne organizirati in seliti v laboratorije, kjer se centralizirata tehnologija in znanje. V 20. stoletju pa se z razvojem majhnih prenosnih aparatov, ki omogočajo hitre rezultate, del testiranja spet premakne v bližino pacienta. Ob tem se začnejo postavljati nova vprašanja glede pravil, zakonske ureditve in zagotavljanja kakovosti.

Po svetu je POCT zakonsko različno urejeno. V EU so medicinske tehnologije strogo urejene z zakoni, ki urejajo varnost in učinkovitost pripomočkov za njihovo življenjsko dobo in trženje. Direktiva 98/79/ES o in vitro diagnostičnih medicinskih pripomočkih, sprejeta leta 1998, je določala splošne standarde za varnost in učinkovitost pripomočkov na tržišču. Če medicinski pripomoček izpolnjuje bistvene zahteve direktive, dobi označo CE, kar pomeni, da je primeren za predvideni namen. Vendar pa direktiva ni več v skladu z mednarodnimi smernicami in zakonskimi sistemi v smislu klasificiranja na osnovi tveganja. Prav tako ne zajema naprav z novejšimi tehnikami in aplikacijami. V naslednjih letih bo zato evropski sektor medicinskih tehnologij prešel z ureditve obstoječih direktiv na dve novi uredbi. Uredbi vzpostavlja sodobnejši zakonodajni okvir EU za boljše varovanje javnega zdravja in varnosti bolnikov. Na osnovi tveganja so in vitro medicinski pripomočki razvrščeni v 4 podrazrede: A, B, C in D, pri čemer je D najvišji razred tveganja. Spremembe v uredbi vključujejo znatno širitev obsega IVD naprav, vključno s testiranjem ob pacientu. POCT po definiciji uredbe pomeni kakršnokoli na-pravo, ki ni namenjena samotestiranju, temveč testiranju izven laboratorija, splošno v bližini ali ob pacientu.

Če direktive in uredbe zajemajo pravila glede IVD pripomočkov, pa način upravljanja z njimi, s storitvami in procesi ali sistemi, določajo standardi. Standard je po definiciji "*sklop pravil, ki nadzirajo, kako ljudje razvijajo in upravljajo materiale, izdelke, storitve, tehnologije, procese in sisteme, ki zagotavljajo zahteve, specifikacije, smernice ali značilnosti, ki jih je mogoče dosledno uporabljati za zagotovitev, da so materiali, izdelki, postopki in storitve primerni za njihov namen.*"

Zahteve za testiranje ob pacientu predstavlja ISO 22870:2016 Point-of-care (POCT) – Requirements for Quality and Competence. Zahteve tega standarda se uporablja jo v povezavi z ISO 15189:2013 – Medicinski laboratoriji – Zahteve za kakovost in kompetentnost, kadar se POCT izvaja v bolnišnici, ambulanti ali zdravstveni organizaciji, ki zagotavlja ambulantno oskrbo.

Skupne zahteve vseh standardov za laboratorijsko testiranje, ki vključujejo tudi testiranje ob pacientu, so: da je testiranje primerno namenu, da se zagotavlja in vzdržuje kakovost testiranja, usposobljenost izvajalcev testov, ustrezno vzdrževanje aparatov in zagotovi določeno skladnost med več ponudniki storitev in shranjevanja pacientovih podatkov.

Za podporo procesom odločanja v skrbi za bolnika so postavljene (oblikovane) smernice, ki temeljijo na najboljših razpoložljivih dokazih, ki izhajajo iz sistematičnega preverjanja razpoložljivih podatkov na podlagi dokazov.

Najbolj prepoznaven vir za učinkovito, varno delo v medicinskih laboratorijih in prav tako za kakovostno izvajanje testiranja ob pacientu so smernice CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute). So mednarodno uveljavljene in globalno sprejete smernice, ki jih na osnovi dokazov pripravljajo člani mednarodnega združenja s postopkom konsenza.

Konsenz za kakovostno izvajanje testiranja ob pacientu pomeni, da je pri uvedbi POCT treba najprej utemeljiti klinično potrebo, zagotoviti sodelovanje laboratorija pri upravljanju, usposobiti izvajalce, verificirati metode in aparate, zagotoviti kakovost izvedbe z doslednim izvajanjem notranje kontrole kakovosti in sodelovanjem v programih zunanje ocene kakovosti ali drugih medlaboratorijskih primerjavah. Vse postopke je treba dokumentirati.

POCT danes pokriva širok nabor testov, omogoča visoko analitično kakovost na osnovi sofisticiranih detekcijskih principov. Razvoj pospešuje raznolikost potreb, vključno s staranjem prebivalstva s številnimi kroničnimi boleznimi, tehnološki napredek, na drugi strani pa pomanjkanje laboratorijskega osebja. Razvoj POCT bo šel predvidoma v dve smeri: v razvoj majhnih ročnih naprav, ki omogočajo kvalitativne in kvantitativne določitve velikega nabora analitov in v smeri razvoja večjih (benchtop) aparatov s poenostavljenim rokovanjem in novimi tehnologijami na molekularni osnovi.

Razvijajo nov tip pametnih telefonov, ki bodo omogočali diagnostične teste, pametne kontaktne leče za spremljanje koncentracije glukoze v solzah, tetovažne senzorje, instrumente, ki uporabljajo zelo majhne količine tekočine na mikročipu za opravljanje določenih laboratorijskih testov. Mikrofluidna naprava lahko za diagnosticiranje bolezni uporablja telesne tekočine ali raztopine, ki vsebujejo celične ali celične dele (lab-on-a-chip). Tehnologija je primerna za številne aplikacije od dostave zdravila do tkivnega inženirstva. Mikrofluidne naprave za biomedicinske aplikacije obravnavajo osnove mikrofluidike in podrobno preučujejo široko paleto medicinskih aplikacij.

Kakovost POCT-a danes in v prihodnosti lahko zagotovimo samo z vključevanjem laboratorijskih strokovnjakov, ki poznajo zapletenost testiranja, pomen regulativnih zahetov, smernic in ustreznih postopkov ter procesov kakovosti.

POCT je del laboratorijske dejavnosti in del zdravstvenega varstva, osredotočenega na paciente, saj hitreji rezultati olajšajo hitreje klinične odločitve, ustrezno testiranje ob pacientu, ki vključuje klinike, druge zdravstvene delavce in laboratorijske strokovnjake pa lahko izboljša oskrbo bolnikov.

## LITERATURA

1. Prezelj M, Bratož S. Priporočila za organiziranje in izvajanje laboratorijskih testov ob pacientu (POCT- Point of Care Testing). SZKKLM, Ljubljana 2014.
2. Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za dovoljenje za delo na področju laboratorijske medicine. Ur.l.64/04
3. Shaw Julie LV, Practical challenges related to point of care testing. Practical Laboratorijska Medicina 4 (2016):22-29
4. Rajendran R, Rayman G. Point of care blood glucose testing for diabetes care in hospitalized patients: an evidence based review. JDST. 2016;8:1081-1090.
5. Price CP. Point of care testing. Clin rev. 2001;322:1285-1288.
6. Larsson A, Greig-Pylypczuk R, Huisman A. The state of point of care testing : a european perspective. Upsala J Med Sci. 2015; 120: 1-10.
7. Kahn SE. Point of Care Testing in the 21st Century: Yesterday, Today, Tomorrow. Point Care. 2016; 15: 176-179.

# Informacijski sistem in obvladovanje POCT področja

**Pika Meško Brguljan**

Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Laboratorij za klinično biokemijo in hematologijo, Golnik, Slovenija

## POCT IN VLOGA LABORATORIJA

POCT je testiranje, izvedeno ob pacientu ali v bližini pacienta, ki ga izvaja nelaboratorijsko – klinično osebje, rezultati testiranja pa lahko vplivajo na takojšnjo spremembu zdravljenja (1, 3, 4). Pri uvedbi in nadzoru nad izvajanjem preiskav POCT je treba upoštevati nacionalna priporočila in mednarodne standarde s področja laboratorijske medicine. Ministrstvo za zdravje (MZ) Republike Slovenije je objavilo pravilnik in spremembe pravilnika o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine (Ur. list RS 64/2004, 1/2016). Ta pravilnik določa strokovne in tehnične pogoje, ki jih morajo izpolnjevati izvajalci preiskav laboratorijske medicine, vključno za področje POCT. Slovenska priporočila za organiziranje in izvajanje laboratorijskih testov ob pacientu (POCT – Point of Care Testing) je izdalо Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM) (4). Zahteve za testiranje ob pacientu opredeljuje tudi mednarodni standard ISO 22870: 2016 Point-of-care testing (POCT) – Requirements for Quality and Competence (3). Zahteve tega standarda se uporablja v povezavi z ISO 15189: 2013 – Medicinski laboratoriji – Zahteve za kakovost in kompetentnost (2).

POCT je del laboratorijske dejavnosti, ki se izvaja na drugačen način, na drugih krajih in z drugimi izvajalci. Laboratorij mora imeti popolno strokovno odgovornost za POCT kot del laboratorijske dejavnosti. Vodenje in nadzor nad POCT mora imeti medicinski laboratorij z veljavnim dovoljenjem ministrstva in/ali specialist z ustreznou specializacijo (1).

Uspešna in kakovostna implementacija testiranja ob pacientu (POCT) je odvisna od številnih dejavnikov, kot so:

- obvladovanje kakovosti POCT,
- usposobljenost uporabnikov – izvajalcev,
- izbor opreme,
- podpora informacijske tehnologije, ...

Odgovornost za uvajanje testiranja ob pacientu in potrditev izvajanja sistema kakovosti v zdravstvenih ustanovah ima interdisciplinarna komisija, ki jo vodi predstavnik laboratorija. Komisijo sestavljajo še zastopnik klinike (zdravnik), zdravstvene nege, finančne službe, predstavnik za informacijski sistem, službe za kakovost (4, 5).

## ORGANIZIRANOST POCT DEJAVNOSTI KLINIKE GOLNIK

Za dobro celovito organiziranost laboratorijske dejavnosti je potrebna uskladitev laboratorijskega testiranja ob pacientu in medicinskega laboratorija.

Na Kliniki Golnik se POCT izvaja pod nadzorom in na način, kot ga opredeli laboratorij (Laboratorij za klinično biokemijo in hematologijo – LKBH). Vodja laboratorija je odgovoren za POCT z vseh vidikov. Odgovoren je za nje-

govo celovito vzpostavitev in kakovostno delovanje.

V sklopu Komisije za kakovost, ki je interdisciplinarno zastopana in jo imenuje direktor, deluje za področje POCT interdisciplinarna komisija. Namen njenega dela je kakovostna in nadzorovana vpeljava POCT.

POCT interdisciplinarno komisijo sestavljajo vodja labora-

torija (predseduje POCT komisiji), zdravnik, ki opravlja delo klinika, predstavnik zdravstvene nege, predstavnik bolnišničnega informacijskega sistema in predstavnik finančne službe. Interdisciplinarna komisija se glede na potrebe lahko razsiri in vključi občasno tudi predstavnika npr. službe za kakovost, službe za preprečevanje in obvladovanje okužb, lekarne, ...

Z namenom zagotavljanja kakovosti in varnosti se redno izvajajo notranji nadzori. Za planiranje in izvedbo je odgovoren predsedujoči POCT komisije. V laboratoriju so imenovani POCT koordinator in njegovi namestniki. POCT je del sistema obvladovanja kakovosti laboratorija LKBH.

Opredeljene naloge koordinatorja (-jev) POCT so:

- priprava pravil, navodil izvajanja ter dokumentiranja dejavnosti ter postopkov za zagotavljanje varnosti,
- usposabljanje osebja,
- nabava in dobava reagentov in potrošnega materiala

ter kontrola sprejemljivosti le-tega za potrebe POCT uporabnikov,

- načrtovanje izvajanja notranje kontrole kakovosti,
- postavitev meril sprejemljivosti in načrtovanje korektivnih ukrepov,
- periodični nadzor nad izvedbo,
- sledljivost zapisov in izvajalcev (podatki o identiteti pacienta, podatki o aparatu, rezultati testiranja pacienta in rezultati kontrolnega vzorca ter datum in čas testiranja, podatki o reagentu, kalibratorju in ostalem potrošnem materialu, podatki o identiteti izvajalca, idr.),
- organiziranje medlaboratorijskih primerjav in/ali sodelovanje v programih zunanje ocene kakovosti,
- pravilno arhiviranje zapisov,
- integriranje POCT podatkov v LIS,
- izvajanje presoj.

## **INFORMACIJSKI SISTEM(-I) KOT PODPORA OBVLADOVANJU POCT DEJAVNOSTI KLINIKE GOLNIK**

Ročno vodenje zapisov in dokumentacije, potrebno za kakovostno obvladovanje POCT, je zelo časovno zamudno, obstaja tudi velika možnost napak. Razvoj informacijske tehnologije je omogočil, da so novejši POCT aparati (6, 7, 8) in celotna dejavnost POCT povezljivi v informacijske sisteme. Optimalna informacijska rešitev je, da je sistem povezan tudi z laboratorijskim in bolnišničnim informacijskim sistemom. To omogoča celovito obvladovanje POCT preiskovanja, hkrati pa ne obremenjuje POCT uporabnikov z uporabo dodatnih informacijskih sistemov. Informacijska podpora mora biti izvedena standardizirano in varno (6, 9, 10, 11, 12).

Na Kliniki Golnik smo po izboru povezljivih POCT aparativ in POCT programske podpore (IT 1000, Roche Diagnostics), izvedli integracijo z laboratorijskim informacijskim sistemom (LIS) Labis (FinPro) in bolnišničnim informacijskim sistemom Birpis (SRC, Infonet). Z namenom celovitega obvladovanja notranjih kontrol kakovosti je bila izvedena tudi integracija s programom Unity RealTime (BioRad), ki ga laboratorij uporablja za vodenje notranje kontrole kakovosti. Izvedena je bila tudi reorganizacija procesa nabave reagentov in potrošnega materiala za potrebe POCT in s tem povezane spremembe v programske opremi za naro-

čanje (GoSoft).

Integrirana informacijska podpora POCT omogoča:

- dostop do podatkov v vseh integriranih informacijskih sistemih je zaščiten z gesлом,
- identifikacija pacienta in izvajalca z uporabo črtne kode,
- izvajanje POCT meritev brez predhodnega vnosa naročil v bolnišnični informacijski sistem (BIS),
- izvajanje, kjer oprema to omogoča, preko varnega brezzičnega omrežja,
- sledljivost vseh potrebnih in zahtevanih podatkov,
- usposobljenost izvajalcev POCT ter dodeljevanje pravic za izvajanje,
- pregled kontrol kakovosti, vzdrževanja, neskladij pri izvajaju,
- ustrezno shranjevanje podatkov,
- pregled rezultatov POCT v BIS in LIS,
- preglednost stroškov POCT idr.

## ZAKLJUČEK

Kakovostne laboratorijske storitve, vključno s testiranjem ob pacientu (POCT), zagotavljamo z vzpostavljivo celovitega sistema kakovosti, ki omogoča spremljanje in obvladovanje vseh faz procesa. POCT je del laboratorijske dejavnosti in mora biti pod nadzorom laboratorija. Izbor povezljive POCT opreme in informacijska podpora z integracijo v laboratorijski in bolnišnični informacijski sistem pomembno vplivata na kakovostno in varno obravnavo pa-

cientov. Omogočata tudi s podatki podprtjo pomoč POCT uporabnikom, sledljivost podatkov ter uvajanje potrebnih korektivnih, preventivnih ukrepov ter izboljšav.

Za uspešno uvedbo informacijske podpore POCT dejavnosti sta zelo pomembna vključenost in sodelovanje strokovnjakov različnih področij, tako laboratorijskih, POCT uporabnikov, informatikov, oddelka za nabavo, dobaviteljev idr.

## LITERATURA

1. Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za dovoljenje za delo na področju laboratorijske medicine. Ur. l. 64/04, 1/16.
2. SISTEN ISO 15189: 2013 – Medicinski laboratoriji – Zahteve za kakovost in kompetentnost.
3. ISO 22870: 2016 – Point-of-care testing (POCT) - Requirements for quality and competence.
4. Prezelj M, Bratož S. Priporočila za organiziranje in izvajanje laboratorijskih testov ob pacientu (POCT- Point of Care Testing). SZKKLM, Ljubljana 2014.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Point-of-Care In Vitro Diagnostics (IVD) Testing; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document POCT4-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Selection Criteria for Point-of-Care Testing Devices; Approved Guideline. CLSI document POCT09-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Point-of-Care Blood Glucose Testing in Acute and Chronic Care Facilities; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document POCT12-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Glucose Monitoring in Settings Without Laboratory Support; Draft Guideline – Third Edition. CLSI document POCT13 (Draft 2). Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
9. A practical guide to global point-of-care –testing. M. Shephard (ed.), CSI-RO Publishing, 2016.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Point-of-Care Connectivity; Approved Guideline – Second Edition, CLSI document POCT01A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. IT Security of In Vitro Diagnostic Instruments and Software Systems; Approved Guideline – Second Edition, CLSI document AUTO11A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Management of Paper-based and Electronic Laboratory Information; First Edition, CLSI document QMS22, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

# POCT jutri

**Petra Malavašič**

Splošna bolnišnica Novo mesto, Diagnostični laboratorij, Novo mesto, Slovenija

POCT je diagnostični test, ki ga po opredelitvi opravljamo zunaj centralnega laboratorija, ob bolniku ali v njegovi bližini, dobljeni rezultat pa vpliva na potek zdravljenja. Danes so želje po izvajanju preiskav ob preiskovancu vedno večje, predvsem zaradi povečane ambulantne oskrbe kroničnih bolnikov, hitre diagnostike življenjsko ogroženih bolnikov in pa tudi zaradi neučakanosti bolnikov, ki želijo do diagnoze priti čim hitreje. Sistemi POCT so danes narejeni izjemno natančno, so zanesljivi in rokovanje z njimi je zelo enostavno. Namen je, da so preiskave na POCT analizatorjih opravljene z enako natančnostjo in zanesljivostjo, kot če bi s krvjo napolnili več epruvet in jih analizirali v centralnem laboratoriju. Sistemi omogočajo avtomatsko kalibracijo in zagotavljajo vodenje sistema kontrole kakovosti (1). Ni presenetljivo, da je POCT najhitreje razvijajoči se segment laboratorijske diagnostike z 9,8-odstotno letno rastjo, ki bo leta 2021 predvidoma vreden 37 milijard dolarjev (2).

Prihodnost laboratorijske diagnostike je v tehnološko dovršenih POCT analizatorjih, ki bodo omogočali analizo več sto analitov hkrati (xPOCT) iz kapljice krvi oz. celo iz neinvazivno odvzetih bioloških vzorcev (urin, slina, znoj, izdihan zrak). Idealni xPOCT naj bi bili sposobni istočasno analizirati različne analite: proteinske molekule, presnovke, nukleinske kisline in celice (3).

Na primer pri infekcijskih boleznih in v nujnih stanjih, ko pomislimo na sepso, bo uporaba xPOCT bistvena za ustrezeno in hitro zdravljenje. Danes je že v uporabi POCT za določanje koncentracije prokalcitonina (PCT), ki se poviša ob sistemskih bakterijskih okužbah. Samo ta informacija pa je premalo za izbiro ustreznega antibiotičnega zdravljenja, ker ne omogoča razlikovanja med vrstami mikroorganizmov. Klasična gojitvena metoda identifikacije povzročitelja poteka več dni, kar pa za pravočasno in ustrezeno zdravljenje predstavlja težavo. Nepravilno antibiotično zdravljenje je lahko neučinkovito in je dejavnik, ki povzroča odpornost na antibiotike. Določitev 8 do 30 vrst patogenov bi zadostovala za preprečitev 80 do 90 % vseh resnih okužb (3, 4).

Odkrivanje povzročiteljev v prvih dnevh okužbe je mogoče z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR), saj omogoča pomnoževanje zelo majhnih količin genetskega materiala mikroorganizmov. V razvoju so PCR POCT, ki delujejo na principu metode PCR za molekularno detekcijo povzročiteljev. PCR POCT je analizator, ki omogoča pomnoževanje odsekov DNA s pomočjo encima DNA-polimeraze in ob dodatku več vrst specifičnih primerjev (za različne vrste mikroorganizmov), konjugiranih z različnimi fluorescenčnimi barvili v eni reakciji (5, 6).

Analiza stotih analitov v majhni in priročni napravi je mogoča samo ob razvoju ustreznih tehnologij. Pri razvoju POCT analizatorjev, ki potrebujejo izredno majhne volumne vzorca in reagentov, je pomembno poznavanje tehnologij mikrofluidike in nanotehnologije, ki se ukvarjata z razvojem sistemov na mikro in nano skali. Zaradi velike površine glede na volumen uporabljenih struktur se lahko na njih veže veliko število tarčnih molekul, kar poveča občutljivost metode. Možno je izvesti veliko eksperimentov vzporedno in v krajšem času, kot bi ga porabili v navadnem laboratoriju. Zaradi manjše porabe reagentov in vzorcev so eksperimenti cenejši in z manj odpadki (1, 7).

Laboratorij na čipu (Lab-on-a-Chip, LOC) je eden od končnih ciljev nanotehnologije in mikrofluidike. LOC vključuje veliko komponent, ki so med seboj povezane in opravljajo določene naloge. Nosilec je lahko narejen iz različnih polimerov; papirja, silikona, stekla ali keramike. Omogočati mora potovanje, ločevanje, mešanje vzorca in reagentov ter detekcijo. Zaradi majhne velikosti mikročipa so analize vzorcev cenejše in hitrejše, proces analize je avtomatiziran, s čimer se zmanjša možnost napak (1).

Obetavno je področje mikrofluidike na papirju kot nosilcu ("laboratorij na papirju"). Je nizko-cenovna tehnologija, ki omogoča hitro analizo več analitov iz kompleksnih bioloških vzorcev. Na celuloznem nosilcu so natisnjeni hidrofobni mikro-kanali, po katerih potuje vzorec do reagentov, natisnjene elektrode in območja s posameznimi reagenti. V razvoju so sistemi POCT za diagnozo HIV, tuberkulo-

ze, spolnih bolezni in malarije. Predvsem države v razvoju potrebujejo takšno poceni in kakovostno laboratorijsko diagnostiko, ki omogoča delo na terenu. Diagnostika je v odročnih krajih brez laboratorijske težka, prav tako zlahka zamenjajo s simptomi drugih bolezni in jo tako nepravilno zdravijo. Zdravnikom bi takšna diagnostika olajšala zdravljenje in tak sistem bi rešil veliko življenj (8).

Pri razvoju nizkocenovnih POCT ima velik potencial uporaba aptamerov namesto pogosto uporabljenih protiteles za vezavo antigenov. Aptameri so laboratorijsko pripravljene nukleinske kisline, ki imajo visoko specifičnost in afiniteto do tarčnih molekul. Aptameri vsebujejo fluorescenčne oznake, kar omogoča enostavno detekcijo. So cenejša in bolj stabilna alternativa protiteles. Njihova kemijska sinteza je enostavna, ni drage proizvodnje v živih organizmih in ni variabilnosti med posameznimi proizvodnimi šaržami. Žal pa so za sedaj uspeli sintetizirati le majhno število aptamerov, ki so bili sposobni močne in specifične vezave tarčnih molekul (7).

Naslednji korak je vgradnja POCT v vsakodnevno uporabljane tehnološke naprave (mobilni telefoni, pametne ure, pametne zapestnice). Danes je vse večje povpraševanje po dostopu posameznikov do svojih zdravstvenih podatkov. Podatki bi se beležili in shranjevali v oblaku in bili dostopni v vpogled izbranemu zdravniku. Obstajajo že aplikacije za merjenje srčnega utripa, kalorij, teže, prehojenih korakov, spanja in drugih fizičnih aktivnosti. Uporabniki ustreznih mobilnih telefonov ali pametnih ur lahko že sodelujejo v izbranih kliničnih študijah. Z zbiranjem in obdelavo teh podatkov bodo raziskovalci izdelali algoritme, ki napovedo alarme za razvoj nekaterih kroničnih (sladkorna bolezen, srčno-žilna obolenja) in drugih bolezni (epileptičnih napadov, avtizma). Takšne raziskave so izredno pomembne, saj omogočajo analiziranje podatkov izjemno velikega števila prostovoljcev, kar na koncu poda realno in izjemno točno sliko populacije (2, 9).

Statistike kažejo na eksponentno rast števila uporabnikov aplikacij na področju zdravja. V povezavi z meritvami, ki nam jih mobilna aplikacija ponuja, pa naletimo na probleme, in sicer kako pomembne so te za nas; ali se bomo na podlagi teh odločili za določene ukrepe in ali se bodo naši zdravstveni kazalniki zaradi daljše uporabe določene aplikacije izboljšali. Lahko pa zagotovo trdimo, da bo osebna diagnostika z analizatorji biološkega materiala za uporabnike izredno privlačna (2, 9).

Zanimiva in privlačna je ideja kontinuiranega določanja krvnega sladkorja preko pametne leče, saj se z razvojem let teh ukvarja veliko tehnoloških podjetij. Leča meri koncentracijo glukoze v solzah. Vsebuje tudi oddajnik, da posreduje podatke v brezžično povezan mobilni telefon. Povprečna koncentracija glukoze v solzah znaša  $0,2\text{--}0,6 \text{ mmol/L}$ , pri diabetikih pa so te vrednosti višje oz. nižje. Tehnologija še ni v uporabi, ker se raziskovalci srečujejo z več problemi (predvsem nizka koncentracija glukoze v solzah otežuje realen preračun v koncentracijo glukoze v krvi). Še bolj privlačna je ideja o neinvazivnem določanju glukoze z uporabo infardečne in ramanske spektroskopije. Ta princip merjenja je za sedaj še v razvojni fazi (10).

V fazah razvoja je tudi mikroskopiranje s kamero mobilnega telefona. Razen povečevalne leče telefoni danes vsebujejo vse primerne komponente za mikroskopiranje. Tako bi lahko v odročnih krajih poceni in hitro diagnosticirali malarijo ali ocenili možnost kontaminacije pitne vode (1).

Ker povprečna starost populacije narašča, narašča tudi potreba po vse večji zdravstveni oskrbi. Tako bo vedno večje povpraševanje po testih za testiranje ob pacientu. Je trend uvajanja sistemov POCT evolucijska ali revolucijska sprememba? Verjetno evolucijska, ki se za sedaj kaže kot podaljšek centralnega laboratorija in ne kot zamenjava le-tega. Ne gre za to, kdo bo prevladal, ali centralizirani laboratoriji ali sistemi POCT. Na koncu mora biti zmagovalec bolnik.

## LITERATURA

1. Vashist SK, Luppa PB, Yeo LY, Ozcan A., Luong HT. Emerging technologies for next-generation point-of-care testing. *Trends Biotechnol.* 2015;33(11):692-705.
2. Vashist SK. Point of care diagnostics: recent advances and trends. *Biosens.* 2017;62:1-4.
3. Dincer C, Bruch R, Kling A, Dittrich PS, Urban GA. Multiplexed Point of care testing - xPOCT. *Trends Biotechnol.* 2017;35:728-742.
4. Peeling RW, D. Mabey D. Point of care tests for diagnosing infections in the developing world. *Clin micro inf.* 2010;16:1062-1069.
5. Lee SH, Kim SW, Kang JY, Ahn CH. A polymer lab-on-a-chip reverse transcription (RT)-PCR based point-of-care clinical diagnostics. *Lab Chip*. 2008;8:2121-2127.
6. Petralia S, Caroci S. PCR technologies for point-of-care testing: Progress and perspectives. *ASC Sens.* 2017;2(7):876-891.
7. Gubala V, Harris LF, Ricco AJ, Tan MX, Williams DE. Point of care diagnostics: status and future. *Anal Chem.* 2012;84(2)487-515.
8. Pal A, Cuellar HE, Kuang R, Caurin HFN, Goswami H, Martinez RV. Self-powered, paper-based electrochemical devices for sensitive point-of-care testing. *AMT.* 2017.2(10):1-72.
9. Xu X, Akay A, Wei H, Wang S, Pingguan-Murphy B, Erlandsson BE, et.al. Advances in smartphone-based point-of-care diagnostics. *P IEEE.* 2015;103(2):236-247.
10. Bruen D, Delaney C, Florea L, Diamond D. Glucose sensing for diabetes monitoring: recent developments. *Sensors.* 2017;1866-1887.

# Sodobna antikoagulantna terapija – POCT včeraj, danes, jutri

**Sabina Jakše Hren**

Splošna bolnišnica Novo mesto, Kardioološki odsek, Novo mesto, Slovenija

Številna bolezenska stanja so povezana z nagnjenostjo h krvavitvam, še več pa s povečanim tveganjem za nastajanje strdkov. V medicini pogosto predpisujemo zdravila z antitrombotičnim učinkom, da skušamo preprečiti nastajanje patoloških krvnih strdkov v žilah oziroma srčnih votlinah, na primer pri bolnikih z umetnimi srčnimi zaklopkami, z atrijsko fibrilacijo ali s povečanim tveganjem za nastanek venske tromboze. Zdravil z antikoagulantnim učinkom je vse več, z izboljševanjem razmerja med njihovo učinkovitostjo in varnostjo ter s staranjem prebivalstva pa število bolnikov, ki jih jemljejo, strmo narašča. Gre za bolnike, ki so močno ogroženi za potencialno usodne trombotične dogodke (npr. pljučna embolija, srčni infarkt in ishemična možganska kap), predpisujemo pa jim zdravila, s katerimi lahko sprožimo ali poslabšamo življenje ogrožajoče krvavitve (možganska krvavitev, retroperitonealni hematom, krvavitev iz prebavil, krvavitve ob poškodbah), zato si želimo, da bi dobro poznali in nadzorovali učinek tovrstnih zdravil.

**HEPARIN** je eno najstarejših bioloških zdravil, močno negativno nabit glukozaminoglikan z veliko molekulsko maso. Glavni pomanjkljivosti heparina sta potreba po kontinuiranem intravenskem zdravljenju zaradi kratke razpolovne dobe ter nepredvidljivost odmerjanja z nujnostjo nadzora njegovega antikoagulantnega učinka. Učinek terapevtskega odmerjanja standardnega, tj. nefrakcioniranega heparina je razmeroma nepredvidljiv in ga moramo preverjati z meritvami aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (APTČ) ali še bolje, z meritvijo antiXa. Referenčne vrednosti so močno odvisne od v laboratoriju uporabljenega reagenta<sup>1</sup>, enako tudi terapevtsko območje APTČ; učinkovitost in varnost zdravljenja pacienta je tako v veliki meri tudi v rokah laboratorija.

V mnogih okolišinah potrebujemo podatek o terapevtskem učinku heparina čim prej. Možna je POCT meritev aktiviranega časa strjevanja krv (ACT, ang. activated clotting time), ki jo rutinsko uporabljajo v kardiokirurgiji in številnih katetrskih laboratorijsih. Novejša naprava *Coagucheck*

z ustreznimi testnimi lističi omogoča tudi POCT meritev aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (APTČ). V SBNM s tem še nimamo izkušenj, ocenjujemo pa, da bi preiskava v tej obliki lahko imela svoje mesto v enotah intenzivne terapije in/ali centralnem operacijskem bloku.

**NIZKOMOLEKULARNE HEPARINE (NMH)**, ki jih pridobivajo z depolimerizacijo standardnega heparina, uporabljamo že več kot 30 let. Imajo daljšo razpolovno dobo od nefrakcioniranega heparina, kar omogoča zdravljenje s podkožnimi injekcijami. Tako standardni heparin kot NMH zavirajo strjevanje krvi posredno z vezavo svoje specifične pentasaharidne sekvence na antitrombin (AT), ki nato učinkoviteje zavira trombin (faktor IIa) in aktivirani faktor X (Xa). (Tudi sintetični pentasaharid fondaparin ima podoben zaviralni učinek na faktor Xa preko vezave na AT.) Različni nizkomolekularni heparini se dokaj razlikujejo po razmerju učinka na faktor Xa in faktor IIa<sup>1</sup>, kar se odraža tudi na občutljivosti diagnostičnih meritev aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (APTČ) ter določitve faktorja antiXa. Učinek nizkomolekularnih heparinov je glede na normalen razpon telesne mase bolnika razmeroma predvidljiv, je pa treba njihov učinek preverjati pri bolnikih s pomembno ledvično okvaro, saj lahko pride do kopičenja zdravila in prekomernega antikoagulantnega delovanja. Raven faktorja antiXa preverjamo tudi v nosečnosti, pri bolnikih z ekstremno debelostjo ter v primeru odpornosti ali zapletov. Za klinike je izrednega pomena, da so rezultati antiXa točni, saj na osnovi rezultatov spremenimo pomembne odločitve o odmerjanju zdravila pri bolnikih, ki utrpijo trombotične in/ali hemoragične zaplete.

**KUMARINI** (varfarin – Marevan<sup>®</sup>, acenokumarol – Sintrom<sup>®</sup>) so najstarejša oralna antikoagulantna zdravila, ki se v medicinske namene uporabljajo že več kot 60 let. Ovirajo jetrno producijo koagulacijskih faktorjev II, VII, IX in X ter tudi proteina C in S preko zaviranja encima epoksid reduktaza vitamina K. Zaradi genetskih polimorfizmov se posamezniki močno razlikujemo v odmerkih zdra-

vil, ki so potrebni za dosego primernega antikoagulantnega učinka. Poln učinek teh zdravil se izrazi šele po petih dneh. Zaradi številnih možnih interakcij na njihov učinek vplivajo številna zdravila, pomemben je tudi vpliv prehrane (vitamin K v živilih) in splošnega zdravstvenega stanja (vročina, driska, okvara jetrne funkcije). Kumarini imajo ozko terapevtsko okno, zato njihov učinek preverjamo z meritvami protrombinskega časa (PČ) in mednarodnega umerjenega razmerja (INR), ki ga uporabljamo zaradi uporabe različnih reagentov (tromboplastina) v različnih laboratorijskih. Pri bolnikih, ki imajo antikoagulantno terapijo s kumarini, so potrebne redne kontrole vrednosti INR in prilaganje tedenske sheme zdravila.

V antikoagulantni ambulanti SBNM smo v sodelovanju z našim diagnostičnim laboratorijem dolgo uporabljali POCT napravo *Trombotrack®*, ki je bila tehnično razmeroma zahetna in je merila protrombinski čas z metodo po Owrenu. Pred leti smo pričeli uporabljati POCT napravo *Coaguchek®* s testnimi lističi, ki je tehnično enostavnejša in nam z ustrezno programsko opremo omogoča neposreden prenos rezultatov INR v program Trombo, ki ga uporabljamo za vodenje bolnikov v antikoagulantni ambulanti. Metodo uporabljajo tudi patronažne sestre na terenu, pa tudi nekaj bolnikov, zlasti mlajših z mehanskimi srčnimi zaklopkami, si je kupilo svojo diagnostično napravo. V obdobju med kontrolami v antikoagulantni ambulanti si lahko občasno sami doma preverijo INR s svojimi lističi, lahko nam tudi sporčijo rezultate meritve in jim po potrebi prilagodimo shemo odmerjanja zdravila.

Antikoagulantna terapija s kumarini je še vedno zlati standard oralne antikoagulantne terapije, saj jo dobro poznamo in je primerna za najširši razpon indikacij (tudi npr. pri bolnikih z mehanskimi srčnimi zaklopkami in pri tistih z dokončno odpovedjo ledvic na hemodializnem zdravljenju), je pa zaradi potrebe po pogostih kontrolah in številnih dejavnikih, ki lahko privedejo do iztirjenja, razmeroma nepraktična.

**NEPOSREDNE (NOVE) ORALNE ANTIKOAGULANTE (NOAK, tudi direktni oralni antikoagulanti – DOAK),** ki jih uporabljamo zadnje desetletje, so proizvajalci razvili z namenom poenostavitev zdravljenja; rutinsko preverjanje koncentracije zdravila oziroma njegovega učinka namreč ni predvideno, zato POCT koagulacijske metode za sedaj nimajo večjega pomena. Med NOAK štejemo zaviralec trombina dabigatran ter neposredne zaviralce faktorja Xa – rivaroksaban, apiksaban in edoksaban. Ta zdra-

vila odmerjamo v fiksnih odmerkih glede na indikacijo in posamezno zdravilo, upoštevajoč nekatere dejavnike, kot so okrnjena ledvična funkcija, telesna teža, starost in tveganje za krvavitve. Njihov učinek je največji ob maksimalni koncentraciji zdravila v krvi, kar je nekaj ur po njegovem zaužitju. Pred uvedbo NOAK vsem bolnikom preverimo hemogram, hepatogram in ledvično funkcijo, kontrole v antikoagulantni ambulanti so ob nezapleteni uporabi bistveno redkejše kot pri kumarinah (po enem mesecu, nato po treh ali šestih mesecih, nato lahko samo enkrat letno za kontrolo ledvične funkcije). V Sloveniji odsvetujemo predpisovanje NOAK pri bolnikih z napredovalo ledvično okvaro ( $\text{oGF} < 30 \text{ mL/min}$ ).

**DABIGATRAN** (Pradaxa<sup>®</sup>) je neposredni reverzibilni zaviralec trombina. Maksimalno koncentracijo v krvi doseže v eni do treh urah po zaužitju, ima slabo biološko razpoložljivost, razpolovni čas zdravila je 14 do 17 ur, 80 % se ga izloči skozi ledvice. Učinek zdravila je predvidljiv, zato reden laboratorijski nadzor ni potreben. V primeru življenjske indikacije imamo na voljo specifični antidot za dabigatran, specifično protitelo idarucizumab (Praxbind<sup>®</sup>). Ob zdravljenju z dabigatranom se podaljšata APTČ in trombinski čas (TČ), ki ju v urgentnih primerih lahko uporabimo za orientacijsko oceno učinka zdravila. V redkih primerih, ko potrebujemo natančno oceno učinka dabigatrana, uporabimo specifično koagulacijsko preiskavo – prilagojeni trombinski čas (komercialni Hemoclot<sup>®</sup> ali npr. hišna metoda laboratorija KO za žilne bolezni UKCLJ).

**RIVAROKSABAN** (Xarelto<sup>®</sup>), je neposredni reverzibilni zaviralec faktorja Xa. Maksimalno koncentracijo v krvi doseže v eni do treh urah po zaužitju, 33 % zdravila se izloči skozi ledvice, njegov razpolovni čas je 8 do 13 ur. Ob zdravljenju z rivaroksabanom se podaljša protrombinski čas. Kadar potrebujemo kvantitativno oceno učinka, uporabimo specifično koagulacijsko preiskavo, določitev anti-Xa, umerjenega na rivaroksaban.

**APIKSABAN** (Eliquis<sup>®</sup>) je neposredni reverzibilni zaviralec faktorja Xa. Maksimalno koncentracijo doseže v treh do štirih urah po zaužitju, 27 % zdravila se izloči skozi ledvice, njegov razpolovni čas pa je 12 ur. Ob zdravljenju z apiksabonom so lahko podaljšani koagulacijski časi (APTČ, PČ), vendar premalo specifično, da bi lahko odražali dejanski učinek apiksabana. Za kvantitativno oceno učinka zdravila lahko uporabimo le specifično koagulacijsko preiskavo, določitev anti-Xa, umerjenega na apiksaban.

Neposredni reverzibilni zaviralec faktorja Xa **EDOKSABAN (LIXIANA®)** v Sloveniji še ni na voljo. Maksimalno koncentracijo doseže eno do dve uri po zaužitju, 35 % se ga izloči skozi ledvice, njegova razpolovna doba je 9 do 14 ur. Tudi za kvantitativno oceno učinka edoksabana je potrebna specifično umerjena določitev anti-Xa.

Rotacijska trombelastometrija (ROTEM®) je diagnostična metoda, ki analizira viskoelastične lastnosti *in vitro* nastega krvnega strdka<sup>2</sup>. Uporablja se lahko tudi kot POCT in lahko daje hitre rezultat z delnim grafičnim prikazom. Poznamo različne ROTEM® teste – test INTEM meri koagulacijo po notranji poti (podobno kot APTČ), EXTEM pa po zunanjji (podobno kot PC). Analizator glede na gibanje

gle ob nastajanju krvnega strdka v vzorcu polne citratne krvi sproti izrisuje krivuljo, iz katere je mogoče odčitati več parametrov – koagulacijski čas (CT), čas nastajanja strdka (CFT), hitrost nastajanja strdka ( ), amplitudo po 10 minutah (A10) in največjo amplitudo (MCF). Z uporabo kartuš je preiskavo mogoče opraviti obposteljno; svoje mesto je našla v sodobnih kirurških dvoranah in enotah kirurške intenzivne terapije. Antikoagulacijska zdravila podaljšujejo CT; nefrakcionirani heparin podaljšuje INTEM CT, kumarini pa EXTEM CT. Podatkov o uporabi ROTEM® pri zdravljenju z NOAK je malo, vendar je glede na priljubljenost diagnostične metode in razširjenost uporabe neposrednih oralnih koagulantov za pomoč v zdravljenju življensko najbolj ogroženih bolnikov pričakovati tudi razvoj v tej smeri.

## LITERATURA

1. Antikoagulacijsko zdravljenje. Uredila: Alenka Mavri. Slovensko zdravniško društvo, Sekcija za antikoagulacijsko zdravljenje in preprečevanje trombemboličnih bolezni pri Združenju za žilne bolezni. Ljubljana, 2017.
2. <https://www.rotem.de/en/products/rotem-sigma/>





**06**

Učinkovitost in  
kompetentnost  
v laboratorijski  
medicini

# Javno naročanje v zdravstvu

**Maja Klun**

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za upravo, Ljubljana, Slovenija

Javno naročanje je pojem, ki označuje naročanje blaga, storitev in gradenj s strani naročnikov, ki se financirajo iz javnih sredstev. V Sloveniji je temeljna zakonodaja na tem področju Zakon o javnih naročilih (ZJN-3 in dopolnitve). Zakonodaja ureja, kdo je obvezno naročnik po zakonu, kdaj oziroma v katerih primerih je treba opraviti javno naročanje, kateri postopki javnega naročanja so možni, katera so temeljna načela javnega naročanja, pravno varstvo v postopkih in vrsto drugih določb. V Sloveniji na letni ravni javni sektor porabi preko javnega naročanja 4 milijarde EUR, zaradi decentralizacije vodenja postopkov javnih naročil pa se s tem ukvarja več kot 6.000 javnih uslužbencev. Problem take razpršenosti je velika možnost napak v postopkih ter nestrokovnost na posameznih področjih. Zaradi večje transparentnosti javnega naročanja je sedaj dokumentacija javno dostopna na portalu javnih naročil in si tako lahko decentralizirane enote in uradniki pomagajo z izkušnjami drugih. Poglavitni cilji javnega naročanja so predvsem v pospeševanju konkurence med ponudniki, preprečevanje korupcije, zagotavljanje finančne discipline, racionalna raba javnih sredstev itd. V praksi doseganje ciljev ni vedno uresničeno zaradi različnih okoliščin. V okviru predavanja so udeleženci spoznali obe področji javnih naročil: infrastrukturno in splošno področje, načela javnega naročanja in postopke javnega naročanja. Pri vsakem področju javnih naročil so z zakonom določene tudi mejne vrednosti. Če nakup nekega blaga, storitve, ... presega mejno vrednost, mora biti izvedeno javno naročanje. ZJN v 21. členu tako določa, da je treba izvesti javno naročilo v primeru infrastrukturnega področja, kadar vrednost nakupa blaga in storitev presega 50.000 EUR, 100.000 EUR v primeru gradenj in 1 milijon EUR v primeru storitev s seznama socialnih in drugih posebnih storitev. Vrednosti so nižje na splošnem področju, in sicer 20.000 EUR (blago in storitve), 40.000 EUR (gradnje) in 750.000 EUR (s seznama socialnih in drugih posebnih storitev). Na seznamu socialnih in drugih posebnih storitev so tudi zdravstvene storitve, znotraj njih pa storitve analize krvi, bakteriološke analize, storitve laboratorijev, ... Zakon omogoča osem različnih postopkov javnega naročanja. Pri določenih postopkih tudi določa, da se za izbor ponudnika upošteva eko-

nomsko najugodnejša ponudba, torej ne samo cena. V teh primerih morajo biti jasno določena vsa merila izbire ponudnika (npr. kakovost, tehnične lastnosti, stroški poslovanja, poprodajne storitve, ...). Posebna vsebina, povezana z javnim naročanjem, so zelena javna naročila, ki se uporabljajo pri nabavi določenega blaga in storitev. V tem primeru so določena še nekatera druga merila, pomembna za izbor blaga (npr. delež eko živil, kakovost svežine, ...).

Po statističnih podatkih iz letnega poročila o javnih naročilih (Ministrstvo za javno upravo, 2018) izhaja, da so v Sloveniji naročniki oddali nekaj več kot 60 % javnih naročil z odprtim postopkom, na drugem mestu so naročila male vrednosti (preko 10 %). Na področju posebnih storitev so bila oddana tri javna naročila s področja zdravstvenih, socialnih in sorodnih storitev v vrednosti 1,4 milijonov EUR. Po podatkih je bila v 90,1 % kot merilo izbora določena cena, v manj kot 10 % je bila merilo ekonomsko najugodnejša ponudba. V okviru predavanja je bilo udeležencem predstavljenih tudi nekaj podatkov s portala eJN, ki kažejo statistiko naročnikov, ponudnikov in vrednost javnih naročil na področjih medicinskega blaga in storitev.

Ob koncu predavanja je bilo predstavljenih nekaj ugotovitev državne revizijske komisije o revizijah postopkov javnega naročila s področja laboratorijske dejavnosti. Največ ugotovitev je povezanih z napačno vodenim postopkom javnega naročila ali izbirnimi merili, ki napotujejo na določenega ponudnika. Kot zanimivost je bila predstavljena tudi raziskava, ki je pokazala na vzorcu 22 izdelkov materiala, da so cene, dogovorjene v okviru pogodb, ki izhaja iz javnega naročanja, nižje od tistih, ki so na voljo v trgovinah. Splošno negativno stališče do javnega naročanja tako ni vedno upravičeno, večji problem pri postopkih javnih naročil predstavljajo dokumentacija in merila za izbiro, ki niso dovolj dorečena, ali jih naročniki ne želijo oblikovati in se potem zreducirajo izključno na ceno.

## LITERATURA

1. Državna revizijska komisija 2018. Sklepi 018-012/2017; 018-301/03; 018-005/2017; 018-036/2017 Available from: (12. 11. 2018) [http://www.dkom.si/iskalnik\\_po\\_odelocitvah\\_dkom/](http://www.dkom.si/iskalnik_po_odelocitvah_dkom/)
2. Elektronsko javno naročanje Republike Slovenije, eJN. Available from: <https://ejn.gov.si/>.
3. Hladnik A. Cenovna ekonomičnost javnih naročil v zdravstvu [Magistrsko delo]. Kranj: A. Hladnik, 2015.
4. Ministrstvo za javno upravo. Statistično poročilo o javnih naročilih, od danih v letu 2017. Ljubljana: MJU, 2018.
5. Zakon o javnem naročanju ZJN-3. Uradni list RS, št. 91/15 in 14/18

# Izboljšave na področju kakovosti in racionalizacija dela v medicinskih laboratorijih

**Aleš Jerin**

UKC Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Ljubljana, Slovenija

## POMEN KAKOVOSTI IN VLOGA MEDICINSKIH LABORATORIJEV

Pri obravnavi bolnikov v zdravstvenem sistemu so rezultati laboratorijskih preiskav vključeni pri dveh tretjinah kliničnih odločitev, tako v diagnostiki kot tudi pri spremljanju zdravljenja. Finančni delež je precej manjši, laboratorijske preiskave v razvitih državah predstavljajo približno 2 % stroškov zdravstvene oskrbe (1).

Ob tako široki vključenosti v obravnavo bolnikov so razumljiva visoka pričakovanja glede zanesljivosti laboratorijskih rezultatov. Zahtevana minimalna kakovost dela laboratorijskega delavnika je na ravni države predpisana s pravilnikom Ministrstva za zdravje (2), ki laboratorijem podeljuje dovoljenja za delo. Nekoliko višje zahteve za kakovost postavlja mednarodni standard ISO 15189 (3), po katerem se lahko akreditirajo vsi medicinski laboratoriji. Kljub dobro opredeljeni regulativi pa še vedno ostaja nekaj šibkih točk oziroma pomanjkljivosti, ena od teh je npr. laboratorijsko testiranje ob preiskovancu.

Stalno nadgrajevanje sistema kakovosti in zviševanje zahodov pri kakovosti laboratorijskega dela lahko pomeni tudi višje stroške laboratorijskega dela. Pri presoji upravičenosti dodatnih stroškov laboratorijskih preiskav je treba ovrednotiti dodatne koristi za bolnika in njihove finančne posledice v celoviti zdravstveni obravnavi. Dodatno pa je zaradi vzdržnosti zdravstvenega sistema nujno upoštevati omejitve, ki so mnogokrat neprijetno povezane tudi z etičnimi vidiki.

Med varčevalnimi ukrepi, ki jih tudi pri laboratorijskem delu izvajajo zdravstvene ustanove, je namesto celovitega pristopa na podlagi poglobljene analize učinkovitosti precej bolj pogosto pavšalno zniževanje stroškov, pri tem ima nezamarljivo vlogo tudi pomanjkanje ustreznih modelov za vrednotenje učinkovitosti laboratorijske diagnostike v celoviti zdravstveni obravnavi bolnika. Naštějemo pa lahko tudi kar nekaj primerov dobre prakse celostnega pogleda na zdravstveno obravnavo bolnika vključno z laboratorijskimi preiskavami.

## PRIMERI DOBRE PRAKSE

Kot enega takšnih primerov lahko izpostavimo prokalcitonin. V prvem obdobju po uvedbi te preiskave se je njeni uporabi skokovito zvečevala in ni bila v vseh primerih zadostno strokovno utemeljena. Zato so bile v UKCL leta 2007 sprejete smernice za naročanje te preiskave (4), ki so pripomogle ne samo k omejitvi nenamenske uporabe, ampak so tudi spodbudile dosledno uporabo v strokovno ute-

melenih primerih. V kasnejšem obdobju uporabe pa je metaanaliza tako v ZDA kot na Kitajskem pokazala, da uporaba prokalcitonina pri akutnih respiratornih okužbah celo omogoča optimizacijo zdravljenja z antibiotiki (5, 6). Manjša poraba antibiotikov in krajsa ležalna doba poleg manjše obremenitve bolnika prispevata tudi k znatnemu znižanju stroškov zdravstvene obravnave.

Primer dobre prakse na področju zgodnjega odkrivanja raka debelega črevesa v Sloveniji je program Svit. V preventivnem presejanju je v okviru tega programa opravljenih približno 170.000 laboratorijskih preiskav letno, dodatno pa je ob pozitivnem rezultatu narejenih še 10.000 kolonosko-

pij (7). Kljub vsej preventivni diagnostiki pa je dolgoročno končni strošek obravnave bolnikov nižji, bolnikom pa program prinaša velike koristi, saj je izid zdravljenja pri zgodnjem odkrivanju bolezni bistveno boljši.

## RACIONALIZACIJA IZVAJANJA LABORATORIJSKIH PREISKAV

Celovita zdravstvena obravnava s poudarkom na preventivni in zgodnji diagnostiki sicer prinaša koristi za bolnike in manjše stroške zdravstvene oskrbe, a obseg laboratorijskega dela je zato še večji. Zato je pomembno, da pogoste preiskave laboratorij opravlja čim bolj racionalno. Varčevanje na račun kakovosti laboratorijskega dela nikakor ni ustrezena izbira, na razpolago pa je kar nekaj drugih tehničnih in strokovnih možnosti za bolj racionalno izvajanje laboratorijskih preiskav. Pri iskanju ustreznih rešitev bi lahko bili v veliko pomoč (bodoči) modeli za vrednotenje učinkovitosti laboratorijev.

Pogosto uporabljana možnost za racionalizacijo izvajanja laboratorijskih preiskav je avtomatizacija in konsolidacija pogostih preiskav in drugih postopkov, za katere so na razpolago zanesljive kakovostne metode. Pri tem je pomembna zmogljiva informacijska podpora, ki lahko omogoči bolj učinkovito delo v analizni in poanalizni fazi. Tehnično pre-

verjanje, avtovalidacija rezultatov po dobro opredeljenih strokovnih merilih (8) in ekspertni sistemi dajejo laboratorijskemu možnost za dvig kakovosti kljub zvečanemu obsegu dela.

Nekateri pristopi k racionalizaciji so povezani z naročanjem preiskav. Prepogosto naročanje preiskav, do katerega prihaja predvsem v sistemih s pomanjkljivo informacijsko podporo v primeru premeščanja bolnikov med oddelki ali ustanovami, zvečuje obseg dela v laboratoriju. Optimizacija naročanja laboratorijskih preiskav pa mora upoštevati strokovna merila, tako v primeru prepogostega naročanja pri spremeljanju stanja bolnikov kot tudi v primeru pomanjkljivega naročanja preiskav. Preiskave, ki so s strokovnega vidika smiselne ali celo priporočene in niso bile naročene, lahko poleg potencialnih posledic za zdravje povzročijo tudi zvišanje stroškov zdravstvene oskrbe. Po nekaterih ocenah (9) je takšnih preiskav precej več kot tistih, ki so po nepotrebnem naročene.

## ZAKLJUČEK

Ob zelo široki vključenosti laboratorijskih preiskav pri zdravstveni obravnavi pacientov je zanesljivost rezultatov laboratorijskih preiskav velikega pomena. Kakovost dela se v medicinskih laboratorijih z leti zvišuje, pri racionalnem izvajaju laboratorijskih preiskav in pri optimizaciji njihovega naročanja pa ostaja še precej možnosti za izboljšave.

Vključitev laboratorijskih preiskav v celosten pogled na zdravstveno obravnavo bolnika tako s strokovnimi, ekonomskimi in etičnimi vidiki je kljub nekaterim primerom dobre prakse še vedno majhna. Pri tem je eden ključnih zadržkov pomanjkanje modelov za vrednotenje učinkovitosti laboratorijev in pomena laboratorijske diagnostike v sklopu celovite zdravstvene obravnave bolnika.

## LITERATURA

1. Rohr UP, Binder C, Dieterle T, Giusti F, Messina CG, Toerien E et al. The Value of In Vitro Diagnostic Testing in Medical Practice: A Status Report. *PLoS One.* 2016;11(3):e0149856.
2. Pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati laboratorij za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine. Ur. L. RS št. 64/2004 in 1/2016.
3. ISO 15189:2012, Medical laboratories – requirements for quality and competence. International Organization for Standardization; 2012.
4. Jereb M, Strle F, Derganc M, Kremžar B, Stecher A, Skitek M et al. Smernice za določanje prokalcitonina v urgentnih ambulantah ter na oddelkih Kliničnega centra. Univerzitetni klinični center Ljubljana; 2007.
5. Schuetz P, Balk R, Briel M, Kutz A, Christ-Crain M, Stoltz D et al. Economic evaluation of procalcitonin-guided antibiotic therapy in acute respiratory infections: a US health system perspective. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(4):583-92.
6. Stojanovic I, Schneider JE, Wei L, Hong Z, Keane C, Schuetz P. Economic evaluation of procalcitonin-guided antibiotic therapy in acute respiratory infections: a Chinese hospital system perspective. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(4):561-570.
7. Mežek G, Novak Mlakar D. Letno poročilo o delovanju Programa Svit za obdobje 1.1. do 31.12.2017. Nacionalni inštitut za javno zdravje, Center za zgodnje odkrivanje raka; 2017
8. Rimac V, Lapic I, Kules K, Rogic D, Miler M. Implementation of the Auto-validation Algorithm for Clinical Chemistry Testing in the Laboratory Information System. *Lab Med.* 2018;49(3):284-291.
9. Zhi M, Ding EL, Theisen-Toupal J, Whelan J, Arnaout R. The landscape of inappropriate laboratory testing: a 15-year meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(11):e78962.

# Analiza učinkovitosti javnih biomedicinskih laboratorijev

**Nejc Lamovšek**

UKC Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Ljubljana, Slovenija  
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za upravo Ljubljana, Slovenija

Pri zdravljenju pacientov je vpleteneih več deležnikov in eden izmed pomembnejših je tudi biomedicinski laboratorij. V študiji so Rohr et al. (2016) ugotovili, da v diagnostiki bolezenskih stanj od 60 do 70 % postavljenih diagnoz temelji na rezultatih, dobavljenih z laboratorijsko analizo pacientevega vzorca. Laboratorijske storitve štejemo med dobrine posebnega družbenega pomena, t.i. meritorne dobrine. Meritorne dobrine so sicer dobrine zasebnega značaja, ki jih država paternistično umesti v javno dobro, s tem zagotovi porazdelitev dobrine med vse državljanе. Biomedicinske laboratorije najdemo na vseh ravneh zdravstvene oskrbe (primarna, sekundarna in terciarna raven) in so tako sestavni del javnih zdravstvenih zavodov. Javna sredstva, namenjena zdravstvu, so omejena in so leta 2017 znašala 3295 milijonov evrov. V Sloveniji v povprečju porabimo 3,5 % izdatkov za zdravstveno varstvo, namenjeno pomožnim službam (laboratorijska dejavnost in transport). In ravno omejenost sredstev sili zdravstvene menedžerje v racionalnejo rabo sredstev, namenjenim javnim zdravstvenim zavodom. St. John et al. (2015) so v članku A call for value based approach to laboratory medicine funding pozvali k ekonomskim študijam, katerih izsledke bi lahko uporabili v modelih za izboljšanje financiranja laboratorijske dejavnosti, z raziskavami bi lahko nato pomagali oblikovati študije, v katerih bi merili možen vpliv storitev z dodano vrednostjo. Eden izmed načinov optimiziranja rabe sredstev je tudi določitev učinkovitosti posameznih enot v zdravstvu in nato sprejetje ustreznih ukrepov za izboljšanje učinkovitosti. Učinkovitost lahko opredelimo kot optimalno uporabo virov, pri kateri stremimo k minimizirанию stroškov proizvodnje in minimiziranju odpadkov s hkratnim maksimiranjem koristi.

Za določitev učinkovitosti opazovanih enot lahko uporabimo več metod, med katerimi so največkrat uporabljeni metode določitve razmerja: linearna regresija najmanjših kvadratov, totalni faktor produktivnosti, stohastična mejna analiza in analiza ovojnici podatkov. V zdravstvu je tako

največkrat uporabljena analiza ovojnici podatkov (DEA). To je neparametrična metoda, v kateri z ustreznopredlitvijo vhodnih in izhodnih (input in output) spremenljivk določimo množico proizvodnih možnosti. Z uporabo optimizacijskega linearnega programiranja pa nato določimo mejo proizvodnih možnosti, t.i. frontier. "Če pri izračunu tehnične učinkovitosti uporabljam model DEA, ki omogoča izračun mer tehnične učinkovitosti, usmerjenih k inputom, lahko ta model dopolnimo z dodatnim problemom linearnega programiranja s ciljno funkcijo, ki minimizira stroške. Rešitev tega linearnega programa so mere stroškovne učinkovitosti. Če pa pri izračunu tehnične učinkovitosti uporabljam model DEA, ki omogoča izračun mer tehnične učinkovitosti, usmerjenih k outputom, lahko poleg izhodiščnega modela DEA oblikujemo dodatni problem linearnega programiranja s ciljno funkcijo, ki maksimira prihodke. S pomočjo tega linearnega programa opredelimo mere prihodkovne učinkovitosti" (Došenovič, 2014). Za določitev učinkovitosti z metodologijo DEA sta v rabi dva modela, in sicer CCR in BCC. CCR predvideva odražanje proporcionalne spremembe inputov na outputih, medtem ko pri modelu BCC sprememba ni proporcionalna.

Raziskav, o učinkovitosti javnih laboratorijev je zelo malo. Večina se ukvarja z določanjem učinkovitosti javnih zdravstvenih zavodov kot celote. Najboljši pregled literature in raziskav s tega področja je v Kohl, Schoefender & Brunner (2018), in sicer je predstavljenih 261 raziskav o uporabi aplikacije DEA na primeru zdravstva. Tako kot lahko večja tehnična učinkovitost (metodologija DEA) v bolnišnicah (Paschal, Mujasi, Eyob, Jaume Puig-Junoy, 2016) privede do velikih prihrankov v zdravstveni blagajni in s tem omogoči izboljšanje in razširitev dostopa do kakovostnega zdravstvenega varstva, lahko podobno sklepamo, da bi izboljšanje tehnične in ekonomske učinkovitosti v laboratorijski dejavnosti omogočilo prihranke zdravstvene blagajne. Archetti, Montanelli, Finazzi, Caimi in Garrafa (2017) so ugotovili, da lahko z ustreznim avtomatizacijo

laboratorijskega dela konsolidirajo delo in ob tem znižajo celotne stroške laboratorija za 12,55 %. Stroške je možno znižati tudi z zniževanjem stroškovne cene laboratorijskih storitev in uporabo ustreznih tehnik upravljanja s človeškimi viri ter tudi z večopravilnimi delegacijami specializiranega osebja, z uporabo popolnoma avtomatske opreme in naprav ter z izvajanjem učinkovitih tehnik nadzora kontrole zalog materiala (Mouseli, Mohsen, Mohammadreza, Samiee in Leila, 2017).

Tako nam lahko metodologija DEA nudi pomoč pri izgradnji tehnično in ekonomsko učinkovitega modela managementa laboratorijske dejavnosti in nudi temelj za nadaljnji razvoj pojmov učinkovitosti, produktivnosti in morda tudi dobičkonosnosti v javni laboratorijski dejavnosti. Z določitvijo optimalne velikosti biomedicinskih laboratorijev pa tudi model načrtovanja mreže in števila laboratorijev v javnem zdravstvu.

## LITERATURA

1. Archetti, C., Montanelli, A., Finazzi, D., Caimi, L., & Garrafa, E. (2017). Clinical laboratory automation: A case study. *Journal of Public Health Research*, 6(1). doi:10.4081/jphr.2017.881
2. Charnes, A., Cooper, W., & Rhodes, E. (1979). Measuring the efficiency of decision-making units. *European Journal of Operational Research*, 3(4), 339. doi:10.1016/0377-2217(79)90229-7
3. Došenović Bonča, P. (2014). *Opredelitev in merjenje učinkovitosti v zdravstvu: primer slovenskih bolnišnic*. Ljubljana: Ekomska Fakulteta.
4. John, A. S., Edwards, G., Fisher, S., Badrick, T., Callahan, J., & Crothers, J. (2015). A call for a value based approach to laboratory medicine funding. *Clinical Biochemistry*, 48(13-14), 823-826. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.07.024
5. Kohl, S., Schoenfelder, J., Fügner, A., & Brunner, J. O. (2018). The use of Data Envelopment Analysis (DEA) in healthcare with a focus on hospitals. *Health Care Management Science*. doi:10.1007/s10729-018-9443-9
6. Mujasi, P.N., Asbu, E.Z., & Puig-Junoy, J. (2016). How efficient are referral hospitals in Uganda? A data envelopment analysis and tobit regression approach. *BMC Health Services Research*, 16(1). doi:10.1186/s12913-016-1472-9
7. Mouseli, A., Barouni, M., Amiresmaili, M., Samiee, S. M., & Vali, L. (2018). Measuring the net profit of laboratory services: A case study in Iran. *Medical Journal of The Islamic Republic of Iran*, 32(1), 62-67. doi:10.14196/mjiri.32.12
8. Rohr U-P, Binder C, Dieterle T, Giusti F, Messina CGM, Toerien E, et al. (2016) The Value of *In Vitro* Diagnostic Testing in Medical Practice: A Status Report. PLoS ONE 11(3): e0149856. pmid:26942417
9. Taheri, A., Shayan Jahromi, S.A. & Lotfi, F. (2016). Efficiency of Clinical Laboratories Affiliated in Shiraz University of Medical Sciences in 2015: An Application of Data Envelopment Analysis. *International Journal of Health Studies*, 2(4), 21-24. doi:10.22100/ijhs.v5i0.176

# OCENA UČINKOVITOSTI JAVNIH BIOMEDICINSKIH LABORATORIJEV – ŠTUDIJA PRIMERA

**Nejc Lamovšek**

UKC Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Ljubljana, Slovenija  
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za upravo, Ljubljana, Slovenija

Za določitev učinkovitosti posameznih analiziranih enot je ena izmed primernejših metod analiza ovojnice podatkov (DEA). Analiza DEA je neparametrična metoda, ki z linearnim programiranjem primerja razmerja med vhodnimi in izhodnimi spremenljivkami (outputi in inputi). Analizirane enote, ki imajo najvišje razmerje med outputi in inputi v primerjavi z ostalimi analiziranimi enotami, predstavljajo mejo (frontier) najučinkovitejših. Kadar imamo poleg količin tudi podatek o ceni input in output spremenljivk, lahko določimo stroškovno učinkovitost. Nadalje z uporabo navzkrižne učinkovitosti prenesemo obtežitve spremenljivk na vse analizirane enote. "Navzkrižna učinkovitost ima s svojo intuitivno razlago manj samovoljnosti dodatnih omejitev in več pravilnih konotacij demokratičnega procesa, ki je v nasprotju z avtoritarizmom od zunaj vsiljenih omejitev" (Doyle & Green, 1994).

Za potrebe testiranja metode DEA na primeru biomedicinskih laboratorijev smo analizirali osem laboratorijskih oddelkov znotraj UKC Ljubljana. Cilj omenjene analize je bil prikaz tehnične učinkovitosti posameznih laboratorijev ter nadaljnje rangiranje laboratorijev z uporabo metode navzkrižne učinkovitosti. Analizirani model obdelave podatkov DEA je temeljil na metodi CCR, ki predvideva proporcionalno spremembu tako inputov kot outputov in je orientiran na input. Za določitev tehnične učinkovitosti smo analizirali naslednje spremenljivke: število delovnih ur, število biomedicinskih analizatorjev, število osnovnih in število specialnih preiskav. Podlago za osnovni izbor spremenljivk za testno analizo nudi študija prima Taheri, Jahromi in Lofto (2016).

V naši analizi sta mejo (frontier) tehnično najučinkovitejših dosegla dva laboratorija. Učinkovitost ostalih se je gibala med 5,6 % do 68 %. V našem testnem primeru je laboratorij z največ opravljenimi delovnimi urami in največjim številom biomedicinskih analizatorjev tehnično najučinkovitejši, saj je tudi število opravljenih osnovnih in specialnih preiskav naj-

više. Laboratorij z najmanjšim številom opravljenih delovnih ur dosega 6,5-odstotno tehnično učinkovitost in je najmanj učinkovit. Laboratorij bi lahko dano raven outputa dosegel z manjšo količino inputov. Nadaljnje smo analizirane laboratorije z uporabo navzkrižne učinkovitosti rangirali. Vsem laboratorijem se je po pričakovanjih učinkovitost znižala, kajti niso bile uporabljene obtežitve, ki bi analizirani laboratorij prikazale v najboljši luči v primerjavi z ostalimi. Najmanjša razlika med določeno in navzkrižno določeno tehnično učinkovitostjo je znašala 1,9 %, največja pa 14,1 %.

Rezultati analize so bili predstavljeni na fokusni skupini specialistov medicinske biokemije v UKC Ljubljana. Glavne ugotovitve fokusne skupine so bile, da je izbrana metoda analize primerna za oceno učinkovitosti javnih biomedicinskih laboratorijev in je v trenutni obliki že primerna za uporabo na primarnem nivoju zdravstvene oskrbe. Za uporabo na sekundarnem in terciarnem nivoju pa so potrebne posamezne spremembe predvsem pri bolj uravnoteženi obtežitvi analiziranih spremenljivk.

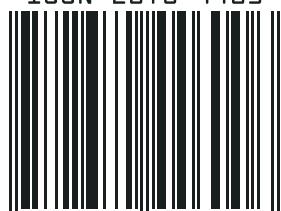
## LITERATURA

- Amirteimoori, A., Cordrostami, S. (2013). Minimizing the Weights Dispersion in Cross-Efficiency Measurement in data envelopment analysis. *International Journal of Data Envelopment Analysis*, 1 (2): 97-106.
- Charnes, A., Cooper, W., & Rhodes, E. (1979). Measuring the efficiency of decision-making units. *European Journal of Operational Research*, 3(4), 339. doi:10.1016/0377-2217(79)90229-7
- Green, R., & Doyle, J. (1996). Improving discernment in DEA using profiling: A comment. *Omega*, 24(3), 365-366. doi:10.1016/0305-0483(96)86991-x
- Taheri, A., Shayan Jahromi, S.A. & Lotfi, F. (2016). Efficiency of Clinical Laboratories Affiliated in Shiraz University of Medical Sciences in 2015: An Application of Data Envelopment Analysis. *International Journal of Health Studies*, 2(4), 21-24. doi:10.22100/ijhs.v5i0.176





ISSN 2670-4463



9 772670 446006

[www.szkklm.si](http://www.szkklm.si)