

PROGRAM PROŠIRENOG NOVOROĐENAČKOG PROBIRA U REPUBLICI HRVATSKOJ - ZAHTJEVI I IZAZOVI PRAVILNOG UZIMANJA SUHE KAPI KRVI

IVA BILANDŽIJA¹, IVO BARIĆ^{2,3}, ANA ŠKARIČIĆ¹, MARIJA ZEKUŠIĆ¹, IVANA KRIŽIĆ¹, DANIJELA PETKOVIĆ RAMADŽA², TAMARA ŽIGMAN², KSENIJA FUMIĆ^{1,4}

Novorođenački probir je u Hrvatskoj od 1986. godine obavezna mjera zdravstvene zaštite novorođenčeta. Krajem 2017. godine uvođenjem tehnologije tandemske spektrometrije masa program novorođenačkog probira je proširen, uz probir na fenilketonuriju i prirodenu hipotireozu na još šest rijetkih nasljednih metaboličkih poremećaja. Cilj je ovog članka ukazati na kompleksnost programa kao i na značajnu ulogu medicinskih sestara u njegovom provođenju. Opširnije su opisani mogući prijeanalitički čimbenici koji utječu na rezultate mjerenja kao i na kvalitetu novorođenačkog probira.

Deskriptori: PROGRAM PROŠIRENOG NOVOROĐENAČKOG PROBIRA, UZIMANJE SUHE KAPI KRVI

Uvod

Rijetke su bolesti prema prihvaćenoj definiciji u Republici Hrvatskoj (RH) i zemljama Europske Unije one bolesti koje se javljaju u manje od pet pojedinaca na 10.000 stanovnika. Danas je dostupno sve više novih lijekova i terapijskih pristupa i za ovu skupinu bolesnika. Kašnjenje u pravodobnom postavljanju dijagnoze, prije pojave nepovratnih oštećenja još uvijek je jedan od problema s kojim se često susreću bolesnici i njihove obitelji.

Laboratorijska dijagnostika sastavni je dio opsežne specijalističke obrade ovih bolesnika. Ona se za rijetke metaboličke i druge prirodene bolesti može provoditi na nekoliko organizacijskih razina: pre-

natalno, u okviru novorođenačkog probira ili kao selektivna dijagnostika nakon postavljene kliničke sumnje. Uspješnost provođenja selektivnog probira ovisi ponajprije o pravodobno postavljenoj kliničkoj sumnji i mogućnosti provođenja analiza prema odgovarajućim postupnicima. Dijagnostička obrada na temelju ovakvog pristupa često je dugotrajna, iscrpljujuća za pacijenta i obitelj, a ponekad do postavljanja konačne dijagnoze mogu proći i mjeseci. Osim toga, neke nasljedne metaboličke bolesti mogu imati vrlo brz tijek gdje svaki dan može biti presudan za povoljan ishod te se stoga zadnjih godina sve više ovih bolesti uključuje u programe novorođenačkih probira pojedinih zemalja ili regija.

Organizacija provođenja proširenoga novorođenačkog probira na rijetke metaboličke i druge prirodene bolesti u Republici Hrvatskoj

Novorođenački probir za određenim rijetkim metaboličkim i drugim prirodnim bolestima sustav je organiziranog traganja u cjelokupnoj novorođenačkoj populaciji neke zemlje (ili regije) s ciljem njihova prepoznavanja prije nego izazovu posljedice po zdravlje djeteta. Takav je dijagnostički pristup složen program

za čije je uspješno funkcioniranje potrebna odgovarajuća podrška državnih ustanova, koordinirani rad velikog broja zdravstvenih djelatnika kao i suradnja roditelja.

Nacionalni plan za rijetke bolesti koji uključuje i proširenje novorođenačkog probira metodom tandemske spektrometrije masa usvojen je 2015. godine odlukom vlade RH. Ovom tehnologijom moguće je analizom niza metabolita iz jednog isječka suhe kapi krvi na filter papiru posumnjati na do 50 nasljednih metaboličkih poremećaja.

Glavni kriteriji za uključivanje neke iz skupine ovih rijetkih bolesti u program novorođenačkog probira trebali bi biti: nemogućnost ranog prepoznavanja, lječivost, razmjerno velika pojavnost, postojanje odgovarajuće dovoljno specifične i osjetljive laboratorijske pretrage. Osim toga, potrebno je razmotriti etičke, medicinske i ekonomske aspekte svakog proširenja. Temeljem navedenih kriterija donesena je odluka o proširenju novorođenačkog probira u RH na, za sada, još šest bolesti: nedostatak acil-CoA-dehidrogenaze srednjih lanaca, nedostatak 3-OH-acil-CoA-dehidrogenaze dugih lanaca (izdvojen ili kao dio manjka tri-funkcionalnog proteina), nedostatak

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

²Klinika za pedijatriju Klinički bolnički centar Zagreb

³Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

⁴Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Adresa za dopisivanje:

Iva Bilandžija, mag. med. biokemije
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku
Klinički bolnički centar Zagreb
10000 Zagreb, Kišpatičeva 12
E-mail: iva.bilandzija@kbc-zagreb.hr

acil-CoA-dehidrogenaze vrlo dugih lanaca, nedostatak karnitinskog nosača, izovaleričku aciduriju i glutarnu aciduriju tipa I. Prve tri navedena bolesti su nasljedni poremećaji razgradnje masnih kiselina. Krajem 2017. godine, nakon nekoliko godina priprema, stekli su se i analitički i organizacijski preduvjeti za provođenje proširenoga novorođenačkog probira tehnologijom tandemске spektrometrije masa (odgovarajuća oprema i osposobljeno osoblje).

Organizacijski se proces novorođenačkog probira može podijeliti na: preanalitičke postupke, analitički dio i postupke nakon pozitivnoga novorođenačkog probira. Iskustva drugih zemalja, koje već dulje vrijeme provode prošireni novorođenački probir, pokazala su da jedino dobro organizirano i usklađeno djelovanje na sve tri razine može u konačnici donijeti dobrobiti novorođenčetu, njegovoj obitelji i društvu u cjelini.

Za uspješno provođenje proširenoga novorođenačkog probira od velike je važnosti odgovarajuće i pravodobno prikupljanje uzoraka iz 32 rodilišta u RH. U ovom dijelu procesa probira ključnu ulogu imaju zdravstveni djelatnici svih hrvatskih rodilišta i neonatoloških odjela kao i patronažne sestre. Analitički dio probira provodi se u Kliničkom bolničkom centru Zagreb u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir. U ovim aktivnostima svakodnevno surađuju specijalisti medicinske biokemije i laboratorijske medicine, laboratorijski inženjeri i tehničari, analitičari (magistar molekularne biologije i magistar kemije), liječnici specijalisti pedijatri i medicinske sestre svih profila Poliklinike pedijatrije i Zavoda za genetiku i bolesti metabolizma Klinike za pedijatriju KBC-a Zagreb. Nadalje, o svakom nalazu koji nije unutar graničnih vrijednosti pedijatri iz tima za novorođenački probir obavještavaju kolege pedijatre i/ili obitelj novorođenčeta. Isto tako, dogovaraju daljnje dijagnostičke postupke i daju upute o eventualno potrebnim terapijskim postupcima s novorođenčecom. Kasnije, ako se dodatnim pretragama potvrdi dijagnoza, preuzimaju praćenje bolesnika u suradnji s pedijatrima iz ostalih zdravstvenih ustanova i uz po-

moć ostalih članova medicinskog tima (medicinske sestre svih profila, magistar nutricionizma, magistar psihologije, ostalih subspecialista).

Početak proširenoga novorođenačkog probira tehnologijom tandemске spektrometrije masa zahtijevao je uvođenje određenih promjena u odnosu na dotadašnji probir na fenilketonuriju i prirodenu hipotireozu (koji se provodio spektrofotometrijskim metodama). Ovom tehnologijom postavlja se sumnja na prije navedene nasljedne metaboličke poremećaje kod kojih je od iznimne važnosti brza reakcija svih sudionika u procesu novorođenačkog probira. Zbog toga je jedan od prvih koraka bio otvaranje službene e-adrese za komunikaciju o novorođenačkom probiru u RH (nprobir@kbc-zagreb.hr). Na ovu e-adresu šalju se sve obavijesti povezane s novorođenačkim probirom (primjerice, obavijesti o pozitivnom rezultatu probira s uputama o daljnjem postupku, obavijesti o uzorcima koji se iz bilo kojeg razloga moraju ponoviti i druge). Sva rodilišta u RH imaju svoje službene e-adrese koje se koriste za potrebe novorođenačkog probira kao i dodatne e-adrese. Osim toga, u svakom rodilištu imenovane su osobe odgovorne za novorođenački probir kao i njihove zamjene. Prispjela e-pošta provjerava se u laboratoriju kao i rodilištima najmanje dvaput tijekom radnog dana (jednom krajem radnog vremena). Osnovni je cilj ovakve komunikacije brža razmjena informacija, poboljšanje razine sigurnosti kao i ukupne kvalitete funkcioniranja nacionalnog programa.

Uloga medicinskih sestara u provođenju novorođenačkog probira

Uvođenje proširenoga novorođenačkog probira u RH uvjetovalo je i novi izgled kartice za uzimanje kapljica krvi na filtarski papir (tzv. Guthrijeve ili PKU kartice) (Slika 1).

Jedan od ključnih čimbenika za uspješno provođenje ovog programa trajna je izobrazba medicinskih sestara svih profila u rodilištima i neonatološkim odjelima kao i patronažnih sestara o svim aspektima organizacije, uzimanja uzoraka i slanja kartica u laboratorij. Iako se čini vrlo jednostavno nakapati

nekoliko kapi krvi iz pete novorođenčeta na označene dijelove filtarskog papira, to u praksi zahtijeva stručnost i iskustvo. Preporučeni postupak detaljno je opisan na poleđini kartice (Slika 1). Preporučamo pogledati postupak i na internetskoj stranici: https://www.youtube.com/watch?v=EnpByF_LgxA (1).

Dio kartice predviđen za uzimanje krvi čini standardizirani filtar papir Whatman 903TM na kome su iscrtana četiri kruga. Svaki krug predviđen je za jednu kap krvi koja odgovara volumenu od oko 50 μ L krvi. Od velike je važnosti za razumijevanje svih drugih preporuka istaknuti da se u postupak mjerenja analita tandemskom spektrometrijom masa uzima uvijek isječak iz kapi krvi od 3 mm za koji pretpostavljamo da sadržava 3,1 μ L krvi (ovisno o hematokritu). To je osnovna pretpostavka od koje se polazi u izračunu koncentracija pojedinih analita kojima se koristimo za postavljanje dijagnostičke sumnje u proširenome novorođenačkom probiru. S obzirom na važnost pouzdanog mjerenja, svako odstupanje od preporučenog načina uzimanja dovodi do znatnih odstupanja u izmjerenim koncentracijama analita i posljedično tome do krivih kliničkih zaključaka sa svim mogućim posljedicama po novorođenče (2).

Kako izgleda kartica i pravilno uzet uzorak suhe kapi krvi za provođenje novorođenačkog probira:

- kartica ima ispunjene sve potrebne podatke o majci i djetetu;
- uzorak je uzet između 48 i 72 sata djetetova života;
- nema zagađenja alkoholom, kremom, puderom iz rukavica, antikoagulanom iz epruveta ili kapilara;
- kartica ima ispunjena sva četiri iscrtana kruga (ili minimalno dva kruga) ravnomjerno na obje strane filtarskog papira (bez više slojeva krvi, bez ugrušaka);
- uzorak je sušen minimalno četiri sata na ravnoj, čistoj, neupijajućoj površini bez izravnog utjecaja sunčeve svjetlosti i topline;

Što ako se kartica nije posušila, ali ipak smo ju poslali da ne čeka drugi dan?

Ako se mokra kartica stavi u pripadajuću plastičnu foliju, dolazi do odvajanja krvne plazme od stanica. Analiza takvog uzorka nepouzdana je i takve se kartice ne uzimaju u obradu (4).

Zašto je važno istoga dana kada je krv uzeta karticu poslati u Odjel za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir Kliničkoga bolničkog centra Zagreb?

Vrlo je važno usvojiti naviku da se kartice šalju svakodnevno neovisno o njihovu broju jer će odgađanje slanja kartica odgoditi dijagnozu bolesti koja se može očitovati već u novorođenačko doba i ugroziti život i zdravlje djeteta. Kartice je potrebno slati istog dana kada je uzorak uzet ili ujutro sljedećega radnog dana (3).

Zašto je važno ispuniti "Potpis osobe odgovorne za uzimanje"?

Na taj način doprinosite kvaliteti provođenja novorođenačkog probira te se može izravno kontaktirati osoba koja je uzimala krv ako je krv neprimjereno uzeta.

Kada će laboratorij zatražiti novi uzorak?

A) kada je uzorak neprihvatljiv za provođenje analize (npr. nedovoljno krvi na filtarskom papiru, previše krvi na filtarskom papiru, neosušena kartica pri primitku u laboratorij, potrgan filtarski papir zbog dodirivanja kartice s petom djeteta, zaliveno područje filtera papira)

B) kada je uzorak uzet prije 48 sati života djeteta

C) kada su rezultati novorođenačkog probira pozitivni, zbog sumnje na jednu od bolesti na koje probiremo.

Najčešća pitanja medicinskih i patronažnih sestara povezana s administrativnim dijelom kartice

Svi podaci o majci i novorođenačetu na kartici moraju biti točni i čitki, popunjeni isključivo kemijskom olovkom. Informacije su nužne za brzo kontaktiranje

roditelja čije novorođenče ima pozitivan rezultat probira. Neispravni i/ili nečitki podaci mogu rezultirati kašnjenjem u dodatnim dijagnostičkim postupcima i liječenju potencijalno bolesne djece.

Zašto je potrebno napisati adresu majke?

Da bi se lakše stupilo u kontakt s roditeljima, odnosno da bi se pravodobno mogla poslati obavijest o pozitivnome novorođenačkom probiru, ili ako postoji potreba za ponovnim uzimanjem.

Zašto je potrebno napisati porođajnu masu i gestacijsku dob?

Nedonoščad ima različite referentne intervale od terminske novorođenčadi, a o tome ovisi tumačenje izmjerenih vrijednosti analita. Za nedonoščad s porođajnom masom manjom od 1800 grama i/ili gestacijskom dobi manjom od 32 tjedna potrebno je uzimati tri puta: između 48 i 72 sata starosti, drugu s dva tjedna starosti i treću s četiri tjedna starosti djeteta. Pri tome je obvezno obilježiti koja je to kartica po redu (3, 6).

Zašto je potrebno ispuniti datum uzimanja i datum prvoga mliječnog obroka?

Kako bismo sa sigurnošću znali da je krv uzeta u preporučenom razdoblju od rođenja (48-72 sata nakon rođenja) i u skladu s time tumačili dobivene rezultate, ako je potrebno, mogli tražiti uzimanje novog uzorka.

Zašto je bitno obilježiti dodatne informacije ako dijete prima infuziju, ima žuticu, prima antibiotike, transfuzije krvi?

Zato što sve navedeno može prouzročiti lažno pozitivne rezultate, a time i sumnju na pojedinu bolest. Poznavanje ovih informacija olakšava tumačenje rezultata (4).

Kada i kako vaditi krv nedonoščadi?

Za nedonoščad potrebno je uzeti tri uzorka. Prvi uzorak uzima se nakon 48 sati života ili pri prijemu na intenzivnu neonatalnu njegu. Druga kartica uzima se s dva tjedna starosti djeteta, a treći uzorak s četiri tjedna starosti djeteta. Treba obra-

titi pažnju da se uzorci, ako je prihvatljivo, uzimaju u navedeno vrijeme prije transfuzija ili primjene potpune parenteralne prehrane ili drugih čimbenika koji mogu utjecati na rezultate analiza (4).

Što ako dijete prima potpunu parenteralnu prehranu?

Potpuna parenteralna prehrana može utjecati na rezultate novorođenačkog probira te je stoga, ako postoji potreba da dojenče prima potpunu parenteralnu prehranu, potrebno je uzeti uzorak suhe kapi krvi u uobičajeno vrijeme (između 48 i 72 sata starosti djeteta) i ispuniti polje na kartici koje se odnosi na potpunu parenteralnu prehranu. Za djecu koja primaju infuziju parenteralne prehrane, potrebno je uzorak prikupiti tri dana nakon prekida infuzije parenteralne prehrane (7).

Pri primitku uzoraka u laboratorij svaki se uzorak upisuje u laboratorijski informacijski sustav (LIS), pri čemu dobije jedinstveni identifikacijski broj. Upisom u LIS moguće je u potpunosti pratiti slijed obrade uzoraka: datum prijama uzoraka, datum analize te na brz način obrađivati velik broj podataka za pojedini uzorak. Uloga LIS-a je automatizacija laboratorija i stvaranje jedinstvene baze podataka. Prema preporuci laboratorij je dužan čuvati uzorke pet godina.

Zaključak

Uvođenje proširenoga novorođenačkog probira tehnologijom tandemске spektrometrije masa još je u fazi tzv. pokusnog (engl. pilot) projekta. U tom se razdoblju obradom rezultata analiza velikog broja novorođenčadi RH optimiziraju granične vrijednosti (engl. cut-off) pojedinih analita izvan kojih se smatra da je probir pozitivan. Takav je pristup uobičajen u svakoj zemlji prvih godina proširenog probira jer se, unatoč radu na istim uređajima i uporabi istih reagensa, granične vrijednosti većine analita u različitim laboratorijima dosta razlikuju. To je dinamički proces stalne reevaluacije rezultata probira i usavršavanja postupaka povezanih s probirom, a s ciljem što je moguće manjeg broja lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata probira. U tom se razdoblju očekuje i veći broj lažno pozitivnih rezultata te stoga i dodatne

obrade većeg broja novorođenčadi. Sve to odvija se pod nadzorom Povjerenstva za novorođenački probir Ministarstva zdravstva RH u kojem su zastupljeni predstavnici svih struka relevantnih za novorođenački probir te udruga roditelja. Kako bi kvaliteta proširenoga novorođenačkog probira u RH bila što bolja, medicinske sestre svih profila uključene u program mogu uvelike doprinijeti stručnim postupcima u preanalitičkoj fazi procesa probira kao i prenošenjem informacija o novorođenačkom probiru izravnim kontaktom s obitelji novorođenčeta.

NOVČANA POTPORA/FUNDING

Nema/None

ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL

Nije potrebno/None

SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST

Autori su popunili *the Unified Competing Interest form* na www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada

u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad./ *All authors have completed the Unified Competing Interest form at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.*

LITERATURA

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (Internet), 2014 (October 23). Newborn Screening DVD Informational Video, Available from: https://www.youtube.com/watch?v=EnpByF_LgxA.
2. M. Holub, K. Tuschl, R. Ratschmann et al., Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry, *Clinica Chimica Acta*, 2006; 373 (1-2): 27-31.
3. Public Health England, Guidelines for Newborn Blood Spot Sampling (Internet), 2016 (March 31). Available from: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/540800/Handbook_March_2016_v1.0.pdf.
4. The Victorian Clinical Genetics Services, Newborn screening collection guidelines, (Internet), 2016 (January 2016) Available from: https://www.vcgs.org.au/sites/default/files/downloads/NBS_collection_guidelines.pdf.
5. Roanna S. George and Stuart J. Moat, Effect of Dried Blood Spot Quality on Newborn Screening Analyte Concentrations and Recommendations for Minimum Acceptance Criteria for Sample Analysis, *Pediatric Clinical Chemistry*, 2016; 62 (3): 466-75.
6. Clinical and Laboratory Institute, NBS01-06, Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs (Internet), 2013 (July 2013) Approved Standard-Sixth Edition, Available from: https://clsi.org/media/1493/nbs01a6_sample.pdf.
7. Wadsworth Center, NYS Department of Health, Newborn screening sample collection guidelines (Internet). New York 2016 (June 2016) Available from: https://www.wadsworth.org/sites/default/files/WebDoc/COLLECTION%20OF%20NBS%20SPECIMENS_FINAL_WEB_June%202016%20.pdf.

Summary

EXPANDED NEWBORN SCREENING PROGRAM IN CROATIA - CHALLENGES AND REQUIREMENTS OF CORRECT DRIED BLOOD SPOT SAMPLING

Iva Bilandžija, Ivo Barić, Ana Škaričić, Marija Zekušić, Ivana Križić, Danijela Petković Ramadža, Tamara Žigman, Ksenija Fumić

Newborn screening in Croatia has been a mandatory health care measure for newborn children since 1986. After introduction of the tandem mass spectrometry technology at the end of 2017, the newborn screening program was expanded to include - along with screening for phenylketonuria and congenital hypothyroidism - six more rare hereditary metabolic disorders. The aim of this paper is to draw attention to the complexity of the screening program and to the important role of nurses in its implementation. Possible preanalytical factors have been described that affect measurement results and the quality of newborn screening.

Descriptors: EXPANDED NEWBORN SCREENING PROGRAM, DRIED BLOOD SPOT SAMPLING

Primljeno/Received: 20. 2. 2018.

Prihvaćeno/Accepted: 19. 3. 2018.