

Posebnosti laboratorijske medicine v pediatriji

Specific characteristics of the pediatric laboratory medicine

Tina Levstek¹, Katarina Trebušak Podkrajšek^{1,2}

¹ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko

² Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

Avtor za korespondenco:

izr. prof. dr. Katarina Trebušak Podkrajšek, spec. lab. med. genet. spec. med. biokem.

Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana,

e-pošta: katarina.trebusakpodkrajsek@mf.uni-lj.si

POVZETEK

Laboratorijska medicina v pediatriji pokriva zelo široko obdobje vse od rojstva do adolescence. Zaradi hitre in intenzivne rasti ter razvoja v tem obdobju je laboratorijska medicina v pediatriji postavljena pred številne izzive. Pri pediatričnih pacientih spremembe v rezultatih laboratorijskih testov ne odražajo samo bolezenskega stanja, ampak tudi spremembe v rasti in razvoju preiskovanca. V preglednem članku navajamo najpogostejše izzive, s katerimi se srečujejo laboratorijski delavci in zdravniki pri laboratorijski diagnostiki v pediatriji, od predanaliznih in analiznih dejavnikov do referenčnih vrednosti in preiskav, ki se izvajajo večinoma le v pediatrični diagnostiki. Pri laboratorijski diagnostiki v pediatriji je zato potreben poseben pristop, ki upošteva razlike pri odvzemu vzorcev, izvedbi laboratorijskih testov, interpretaciji le-teh in drugačno pojavnost nekaterih bolezni v primerjavi z odraslo populacijo. Kljub številnim izzivom laboratorijska medicina v pediatriji pomembno prispeva k postavitvi diagnoze in s tem boljši obravnavi dojenčkov, otrok in mladostnikov. Za čim bolj kakovostno klinično obravnavo otrok pa je nujno tesno sodelovanje med laboratorijskim osebjem in zdravniki.

Ključne besede: laboratorijska medicina, pediatrija

ABSTRACT

Pediatric laboratory medicine covers a very wide period from birth to adolescence. Due to rapid and intense growth and development during this period, pediatric laboratory medicine faces many challenges. The differences in laboratory test results do not only reflect the changes associated with pathophysiological processes but also mirror growth and development. In this review article, we list the most common problems encountered by laboratory workers and clinicians in pediatric laboratory diagnostics from preanalytical and analytical factors to reference values and tests that are usually unique to pediatric diagnostics. It is important to be aware of a special approach in pediatric medicine, as significant differences exist in sample collection, test performance, test interpretation, and disease frequencies. Despite many challenges, pediatric laboratory medicine makes an important contribution to diagnosis and, consequently better treatment of infants, children, and adolescents. Close collaboration between specialists in laboratory medicine and clinicians is paramount to improve health outcomes in this age group.

Key words: laboratory medicine, pediatrics

UVOD

Laboratorijska diagnostika v pediatriji je postavljena pred številne izzive, saj obsega široko obdobje vse od rojstva do adolescence (1). Takoj po rojstvu se začne prilagajanje novorojenčka na življenje izven maternice, kar vodi v spremembe številnih laboratorijskih parametrov. Večina organskih sistemov ob rojstvu je še v razvoju, kar lahko vodi v dihalno stisko (nerazvitost pljuč), motnje v ravnotežju vode in elektrolitov (nerazvitost ledvic) ter zlatenico (nerazvitost jeter). Zaradi krajše življenjske dobe eritrocitov, manjšega izločanja bilirubina v črevo in nepopolne jetrne funkcije (2) je pogost pojav v prvih dneh po rojstvu zlatenica zaradi hiperbilirubinemije (3). Hitra rast v prvih letih življenja in med puberteto se odraža v cikličnih spremembah označevalcev rasti skeletnega sistema, spolno dozorevanje pa v velikih spremembah izločanja spolnih hormonov, kar vodi v razvoj sekundarnih spolnih znakov in nenazadnje v odraslost (3). Spremembe v rezultatih laboratorij-

skih preiskav, za razliko od odrasle populacije, torej niso le posledica patoloških procesov, ampak tudi intenzivnega razvoja in rasti. Zato je interpretacija rezultatov običajno zahtevnejša in terja določeno mero izkušenj. Poleg tega poseben izziv predstavljajo bolezni, ki se pojavljajo večinoma ali izključno samo v pediatrični populaciji, npr. genetske, imunske, infekcijske in endokrinološke bolezni (1). Laboratorijska diagnostika teh bolezni zahteva nekatere specifične metodološke pristope, ki se zato bolj pogosto uporabljajo v pediatričnih laboratorijih. Nič manj zahtevni nista tudi predanalizna in analizna faza, v katerih se pojavljajo nekatere unikatne težave, ki pri odraslih niso prisotne (1, 4). Pregled nekaterih najpomembnejših izzivov pediatrične laboratorijske diagnostike je zbran v Tabeli 1. Podrobneje so opisani v nadaljevanju, skupaj s pristopi za učinkovito soočanje z njimi.

Tabela 1: Izzivi v laboratorijski medicini v pediatriji

Table 1: Challenges in pediatrics laboratory medicine

Odvzem vzorca	Postavitev meril za odvzem najmanjšega možnega volumna vzorca in uporaba ustreznih vsebnikov/zbirnikov. Ustrezno usposobljeno osebje za čim manj boleč in stresen odvzem.
Majhen volumen vzorca	Uporaba analizatorjev, ki potrebujejo za analizo čim manjši volumen vzorca in imajo majhen mrtvi volumen.
Referenčne vrednosti	Kjer je le mogoče, uporaba referenčnih vrednosti glede na starost. Uporaba podatkovnih baz za postavitev referenčnih vrednosti. Predvsem pri nedonošenčkih je interpretacija rezultatov še posebno zahtevna, zato so potrebne ustrezne izkušnje.
Specifične in redke bolezni v pediatriji	Vpeljava metod za diagnosticiranje bolezenskih stanj, ki se pojavljajo predvsem v pediatrični populaciji in postavitev diagnostičnih algoritmov.
Sodelovanje	Komunikacija med laboratorijskim osebjem in zdravniki je ključna za identifikacijo možnih dejavnikov, ki vplivajo na rezultat laboratorijskega testa in pravilno interpretacijo rezultatov.

»

PREDANALIZNI DEJAVNIKI

Dva od najpomembnejših predanaliznih dejavnikov v pediatrični laboratorijski diagnostiki sta starost pacienta in odvzem vzorca (1). V primerjavi z odraslo populacijo je odvzem vzorcev običajno zahtevnejši. Izbira mesta odvzema krvi je odvisna od starosti pacienta, potrebnega volumna vzorca ter vrste laboratorijskega testa. Za odvzeme krvi pri dojenčkih in otrocih je potrebna posebna usposobljenost, da je odvzem čim manj boleč in se tako prepreči morebitne poškodbe (5).

Kapilarna kri je primeren vzorec le za omejeno število preiskav zaradi majhnega volumna ter možne kontaminacije s celično in medcelično tekočino (6). Poleg tega se koncentracije nekaterih analitov razlikujejo med kapilarno in vensko krvjo. Tako so na primer vrednosti glukoze, laktat dehidrogenaze (LDH), aspartat aminotransferaze (AST), hemoglobina, povprečnega volumna eritrocitov (MCV), povprečnega volumna trombocitov (MPV), parcialnega tlaka kisika (pO_2) in nasičenosti krvi s kisikom (sO_2) višje, vrednosti kalcija, kalija, natrija, celokupnih proteinov, parcialnega tlaka ogljikovega dioksida (pCO_2), trombocitov in povprečne koncentracije hemoglobina v eritrocitih (MCHC) pa nižje v kapilarni krvi v primerjavi z vensko (6). Čeprav se omenjene vrednosti značilno razlikujejo med vensko in kapilarno krvjo, običajno niso klinično pomembne, saj so manjše od 5 %. Vseeno je pri podajanju rezultatov iz kapilarne krvi potrebna pazljivost, saj so referenčne vrednosti večinoma podane za meritve v venski krvi. Na izvidu je zato treba označiti, da gre za meritve v kapilarni krvi. Če bi lahko to vplivalo na interpretacijo, je svetovan posvet z zdravnikom in po potrebi odvzem venske krvi (6). Mesto odvzema kapilarne krvi je odvisno od starosti in teže pacienta. Pri dojenčkih do šestega meseca starosti in teže od 3 do 10 kg je najprimernejše mesto odvzema kapilarne krvi medialni oz. lateralni del pete, pri dojenčkih, starih več kot šest mesecev in s težo nad 10 kg pa je mesto odvzema prst na roki (sredinec ali prstanec) (5). V Sloveniji so ta priporočila zbrana v knjižici *Priporočeni postopek za odvzem kapilarne krvi*, ki jo je izdalo Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino, in je bila pred kratkim revidirana (6).

Pri odvzemu venske krvi je treba posebno pozornost nameniti volumnu odvzete krvi. Pogosto se namreč zgodi, da je celotni odvzeti volumen krvi glede na naročeno število preiskav večji od potrebnega (7). Oblikovanje priporočil

za odvzem optimalnega volumna krvi, v katerih je poleg starosti in teže pacienta upoštevano tudi število naročenih testov ter morebitne ponovitve meritev in redčitve, je zato izjemno pomembno (4). Pri dojenčkih in majhnih otrocih, še posebej kritično bolnih, lahko prevelik volumen odvzete krvi namreč vodi do iatrogene anemije (8), zaradi česar je lahko potrebna tudi transfuzija krvi (3). Največji dovoljeni volumen odvzete krvi je odvisen od celotnega volumna krvi preiskovanca. Pri dojenčkih do dveh mesecev je največji dovoljeni odvzeti volumen na dan do 3 % celotnega volumna krvi, pri dojenčkih, starejših od dveh mesecev pa ne več kot 10 % (9). Priporočila veljajo za zdrave otroke, pri bolnih je največji dovoljeni volumen še manjši. Za odvzem manjših volumnov krvi se običajno uporabljajo mikroeprovete namesto standardnih za odvzem pri odraslih. S tem se izognemo nepopolnemu polnjenju in nestreznemu razmerju med krvjo in antikoagulantom, kar lahko vodi v napačne rezultate analiz (npr. pri testih strjevanja krvi), hemolizo ali spremenjeno morfologijo celic (4). Ker imajo dojenčki in otroci manjši premer ven, za odvzem uporabljamo tanjše igle, kar lahko vodi v hemolizo in lažno hiperkaliemijo (3). Zaradi majhnega volumna odvzetega vzorca je zelo pomembno, da preprečimo izhlapevanje pred samo analizo, saj lahko že majhne količine izhlapele tekočine vodijo v velike spremembe v koncentraciji analita. Pri volumnu seruma 2 mL se koncentracija v štirih urah zaradi izhlapevanja poveča za 10 %, medtem ko je pri volumnu 0,5 mL povečanje koncentracije kar 50 % (10).

Pri dojenčkih in majhnih otrocih, ki še ne morejo nadzorovano urinirati, je težaven tudi odvzem urina. Za odvzem uporabljamo posebne plastične vrečke s hipoalergenim adhezivnim sredstvom, ki naj jih, če je le mogoče, namesti zdravstveni delavec, in sicer na dobro očiščeno in osušeno področje presredka okoli izvodil. Pri deklicah moramo biti previdni, da območje rektuma ostane zunaj odprtine, pri fantkih pa vrečko natakemo na penis ter prilepimo na presredek. Sterilne plastične vrečke naj bodo prilepljene največ eno uro, ker se po tem času močno poveča možnost kontaminacije. Morebitno uriniranje preverjamo na 15 minut, po uriniranju vrečko čim prej odstranimo in vzorec prelijemo v urinski lonček (11).

ANALIZNI DEJAVNIKI

Največjo omejitev pri analiziranju pediatričnih vzorcev pogosto predstavlja majhen volumen razpoložljivega vzorca (4). To zahteva uporabo prilagojenih instrumentov, ki za izvedbo analize potrebujejo majhen volumen vzorca in imajo čim manjši mrtvi volumen. Prvo zahtevo analizatorji dandanes večinoma izpolnjujejo, saj so potrebni volumni za analizo običajno zelo majhni. Večji potrebni volumen in s tem težavo predstavlja mrtvi volumen. Mrtvi volumen je volumen, ki je potreben za normalno delovanje instrumenta oz. volumen, pod katerim pipetiranje ni mogoče. Zavedati se je treba, da je velikost mrtvega volumna odvisna tudi od uporabljenih epruvet. Zaželeno je tudi, da je metoda, ki se uporablja za analizo pediatričnih vzorcev, čim manj občutljiva na hemolizo in hiperbilirubinemijo, ki sta pogosti interferenci pri pediatričnih vzorcih (1).

Če je le mogoče, je v pediatriji bolj priporočljiva uporaba polne krvi kot seruma ali plazme. Hematokrit namreč vpliva na količino seruma v vzorcu. Večji kot je hematokrit,

večji volumen vzorca je potreben za pridobitev zadostnega volumna seruma. To je še posebej pomembno pri nedonošenčkih in novorojenčkih, ki imajo tudi do 70 % hematokrita, medtem ko je vrednost hematokrita pri starejših otrocih in odraslih pod 50 %. Tudi plazma predstavlja le okoli 40–60 % polne krvi (3, 4).

Zaradi majhnega razpoložljivega volumna vzorca v pediatrični laboratorijski diagnostiki vedno večjo veljavo pridobiva tudi testiranje ob preiskovancu (POCT, angl. Point of Care Testing) (1). Poleg tega je prednost POCT tudi, da predpriprava vzorcev običajno ni potrebna, in da so rezultati analiz hitro dostopni, kar je še posebej pomembno pri kritično bolnih pediatričnih pacientih (4, 12). Takojšen rezultat pri uporabi testov POCT, ki vpliva na potek zdravljenja, je tudi glavni razlog za njihovo uporabo. Ker POCT testiranje izvaja večinoma nelaboratorijsko osebje, morajo biti testi enostavni za uporabo in robustni, da na rezultat vpliva čim manj zunanjih motenj in vplivov (12).

REFERENČNE VREDNOSTI

Interpretacija rezultatov, skladna s starostjo pacienta, je pri pediatrični populaciji ključnega pomena, saj uporaba napačnih referenčnih intervalov vodi v napačno ali poznejšo postavitev diagnoze, neoptimalno zdravljenje in povečanje stroškov zaradi nepotrebnih dodatnih preiskav. Za večino analitov referenčne vrednosti za odrasle niso primerne za uporabo v pediatrični populaciji (13). Referenčne vrednosti morajo namreč upoštevati rast in razvoj organizma, vseeno pa sama kronološka starost ni vedno najboljša osnova za interpretacijo rezultatov (1, 14), saj na interpretacijo vplivajo tudi številni dejavniki, kot so prezgodnje dozorevanje, spremembe v puberteti in nedonošenost (1), ki jih je treba upoštevati. Poleg tega je določitev posameznih podskupin referenčnih intervalov pogosto težavna, zato so skupine (npr. glede na starost) pogosto arbitrarno določene (4, 14). Tako se lahko zgodi, da po rojstnem dnevu pacient pade v drugo referenčno skupino in vrednosti, ki so bile prej patološke, postanejo normalne ali obratno. Najbolj težavno skupino pri postavitvi referenčnih vrednosti predstavljajo nedonošenčki, pri katerih za postavitev referenčnih vrednosti še vedno največkrat uporabljamo obstoječe podatke iz laboratorijskega informacijskega sistema (13). Sodelovanje z zdravniki in

opredelitev skladnosti interpretacije rezultatov s klinično sliko sta zato ključnega pomena.

Poseben izziv predstavlja tudi sama postavitev referenčnih intervalov za pediatrično populacijo, saj je odvzem vzorcev zdravim nedonošenčkom, dojenčkom in otrokom etično sporen (1). Kljub temu je bil v zadnjem desetletju narejen velik napredek pri postavitvi referenčnih vrednosti za pediatrično populacijo, saj je bilo izpeljanih več prospektivnih in retrospektivnih študij. Med največje spadajo kanadski projekt CALIPER (*Canadian Laboratory Initiative on Pediatric Reference Intervals*) (15), skandinavski projekt NORICHILD (16), nemški projekt KiGGS (*the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents*) (17) in ameriški projekt NCS (*the National Children's Study*) (18). Te študije so izjemnega pomena, saj omogočajo laboratorijem, da pridobljene referenčne vrednosti prenesejo v svoj laboratorij. Postavitev referenčnih vrednosti je namreč drag in dolgotrajen postopek. Pri prenosu referenčnih vrednosti predpostavljamo, da so bile prvotne referenčne vrednosti pridobljene z ustrežno izvedeno preiskavo, pri samem prenosu pa je tre- »

ba upoštevati, katera metoda je bila uporabljena za določitev referenčnih vrednosti, in da sta populaciji pacientov primerljivi. Če ta dva pogoja nista izpolnjena, prenos ni smiseln. Pomembno je, da laboratorij prenesene referenčne vrednosti testira na manjši skupini referenčnih posame-

znikov in s tem preveri uporabnost referenčnih intervalov na svoji populaciji (19). Referenčne vrednosti presnovkov pri presejalnih testih so pogosto odvisne od genetske strukture populacije, kar je zelo pomembno tudi pri prilagoditvi referenčnih vrednosti pri neonatalnem presejanju (20).

BOLEZNI V PEDIATRIČNI POPULACIJI

Pri zdravih novorojencih laboratorijska diagnostika običajno ni potrebna, velik pomen ima le presejalna diagnostika, s katero prepoznamo bolezenska stanja, ki bi lahko negativno vplivala na nadaljnji razvoj ali celo povzročila prezgodnjo smrt. Presejalna testiranja uporabljamo za bolezni, pri katerih lahko z zgodnjo diagnostiko njihov razvoj preprečimo ali upočasnimo, v nekaterih primerih le z uvedbo ustrezne diete (3). Za presejalna testiranja se uporabljajo visoko občutljivi testi, s tem pa je zagotovljeno, da je število lažno negativnih rezultatov čim manjše. Vse pozitivne rezultate namreč nato potrdimo z bolj specifičnimi testi, da izločimo lažno pozitivne (21). V Sloveniji se je leta 2018, poleg fenilketonurije in kongenitalnega hipotiroidizma, testiranje razširilo na dodatnih 17 prirojenih presnovnih bolezni (22).

Številna bolezenska stanja se pojavljajo pretežno oz. izključno v pediatrični populaciji. Mednje sodijo genetske, endokrinološke, imunske in nalezljive bolezni (1, 3, 4). Zato se številne laboratorijske preiskave, ki so usmerjene v diagnostiko teh bolezni, pri pediatričnih pacientih pogosteje izvajajo kot pri ostalih preiskovancih. Ustrezna izbira testov, ki jih izvaja laboratorij, je ključnega pomena za odkrivanje teh bolezni, skupaj s postavitvijo diagnostičnih algoritmov. Izbira analizne metode je večstopenjski proces, ki je med drugim odvisen od namena analize, klinične slike preiskovanca, molekularnih mehanizmov ter razpoložljivega časa in finančnih sredstev (23, 24). V zadnjih letih je prišlo do velikega napredka biokemičnih in genetskih metod za diagnostiko bolezni. Pri biokemični analizi sta postali ključni tehniki tandemske masne spektrometrije in plinske kromatografije, medtem ko sta pri genetski analizi pomembni predvsem molekularna kariatipizacija in sekvenciranje naslednje generacije (NGS) (25).

Kromatografske metode za diagnostiko prirojenih bolezni presnove pri otrocih

Prirojene bolezni presnove so velika skupina genetskih bolezni, ki so posledica okvare ali odsotnosti genskih zapisov sodelujočih molekul presnovnih poti, predvsem encimov. To vodi v kopičenje presnovkov in njihovih stranskih produktov, ki lahko zaradi svoje toksičnosti vplivajo na normalno delovanje celic (26). Medtem ko se nekatere izmed njih izrazijo že kmalu po rojstvu, se predvsem pri pacientih z višjo preostalo encimsko aktivnostjo lahko izrazijo tudi kasneje v otroštvu ali adolescenci, največkrat zaradi prisotnosti različnih sprožilnih dejavnikov, kot so okužbe, povišana telesna temperatura, visok proteinski vnos, stradanje, velik telesni napor in nekatera zdravila (27). Prirojene bolezni intermediarne presnove, ki jih predstavljajo predvsem motnje presnove aminokislin in maščobnih kislin, diagnosticiramo z določanjem acilkarnitinov, aminokislin in organskih kislin v različnih bioloških tekočinah in tkivih (28). V nekaterih primerih je za postavitve diagnoze potreben odvzem med akutno fazo bolezni, saj je le takrat raven presnovkov značilno zvišana (29).

Tandemska masna spektrometrija (MS/MS) omogoča hitro ter tako kvalitativno kot kvantitativno določanje acilkarnitinov in aminokislin (25). Priporočeni vzorec je plazma, saj v primerjavi s serumom omogoča hitrejšo obdelavo, možno pa je tudi določanje presnovkov iz krvnih madežev, izluženih (ekstrahiranih) iz filtrskega papirja, ki se uporablja predvsem pri presejalnem testiranju novorojencev (26, 29). Pred samo analizo je potrebna izolacija presnovkov, deproteinizacija, s čimer se odstranijo intaktni proteini, in derivatizacija, ki izboljša ionizacijo in analitsko

specifičnost. Pri bolj občutljivih analizatorjih derivatizacija ni potrebna (26, 28). Sledi ločitev presnovkov in njihovih stabilnih izotopsko označenih internih standardov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Pri presejalnem testiranju novorojencev se ločba s HPLC ne izvaja, kar pripomore h krajšemu času analize. Pred vstopom v masni spektrometer v ionizatorju poteče ionizacija. V prvem masnem analizatorju se ioni ločijo na osnovi njihovega razmerja med maso in nabojem (m/z). Po fragmentaciji z inertnim plinom v kolizijski celici sledi ponovna ločitev glede na m/z v drugem masnem analizatorju, ki ji sledi detekcija (29).

Organske kisline se določajo s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masnim detektorjem (GS-MS), ki omogoča robustno in ponovljivo analizo v kratkem času (26). Najprimernejši vzorec je običajno urin, saj organske kisline zaradi majhne molekulske mase prehajajo glomerulno membrano. Pred samo analizo je potrebna izolacija organskih kislin iz urina in derivatizacija (26). Ločevanje temelji na osnovi njihove velikosti in hlapnosti z uporabo kolone, ki vsebuje plinsko mobilno in tekočo stacionarno fazo. Mobilna faza omogoča premikanje hlapnih komponent, ki se zadržujejo v stacionarni fazi, skozi kolono. Po ionizaciji v ionskem izvoru masni detektor posname masni spekter posamezne komponente. Za identifikacijo je potrebna primerjava masnih spektrov s spektri, dostopnimi v knjižnicah (29). GC-MS ni primeren za analizo termolabilnih aminokislin, kot so cistein, citrulin in taurin, omogoča pa določitev velikega števila analitov z visoko resolucijo, občutljivostjo in specifičnostjo, kot tudi identifikacijo neznanih presnovkov s pomočjo obsežnih knjižnic (26).

Molekularna kariotipizacija in sekvenciranje naslednje generacije v diagnostiki genetskih boleznih pri otrocih

Obseg genetskega testiranja je izjemno širok, saj lahko določimo spremembe v številu posameznih genomskih lokusov, kot so pridobitev ali izguba celotnih kromosomov (aneuploidije), kot tudi spremembe v strukturi (translokacije, insercije, inverzije) in zaporedju genoma (polimorfizmi posameznih nukleotidov (SNP) ter spremembe v številu kopij (angl. *copy number variations*, CNV), ki vključujejo tako spremembe v številu kopij posameznega gena kot tudi kratke insercije, delecije in duplikacije) (24, 30). V preteklosti so za

ugotavljanje genetskih boleznih uporabljali predvsem analizo kariotipa z G-proganjem kromosomov in sekvenciranje po Sangerju, danes pa prevladujejo metode, ki temeljijo na molekularni kariotipizaciji (imenovane tudi kromosomske mikromreže ali komparativna hibridizacija z uporabo mikromrež) in sekvenciranju naslednje generacije (NGS) (24), ki so pomembno prispevale k izboljšani diagnostiki kompleksnih genetskih boleznih tudi pri pediatričnih pacientih.

Molekularna kariotipizacija temelji na metodi primerjalne genomske hibridizacije z uporabo mikromrež (aCGH) in molekul DNA, označenih z različnimi barvili. Po vezavi na kratka zaporedja DNA, imobilizirana na stekelcu, se zazna razliko v jakosti signala med preiskovančev in referenčno DNA (31). Metoda ima v primerjavi s kariotipizacijo kar nekaj prednosti: ni potrebe po delecijah se celicah, omogoča objektivnejšo interpretacijo rezultatov in predvsem ima boljšo občutljivost, saj lahko zazna CNV v velikosti 10–20 kb. Njene slabosti pa so, da ne zazna uravnoveženih translokacij, ki ne spremenijo CNV, in točkovnih genetskih sprememb, delecij ali duplikacij na ravni posameznega gena. Veliko težavo predstavljajo tudi CNV neznanega pomena, saj vse CNV in njihova patogenost še niso znane (31, 32). Molekularna kariotipizacija se uporablja predvsem za prepoznavanje prirojjenih kompleksnejših večorganskih nepravilnosti ali prizadetosti in kognitivnih manjrazvitosti (31, 32).

NGS ali masivno paralelno sekvenciranje je metoda hkratnega sekvenciranja milijonov fragmentov DNA, ki je bila hitro vpeljana v klinične laboratorije zaradi možnosti analiziranja več genov ali genskih regij hkrati (33). Po obsegu delimo NGS na tri skupine (32). Najbolj usmerjeno sekvenciranje je z analizo izbranega panela genov. To so geni, ki so nedvoumno povezani z določenim kliničnim fenotipom. Število genov na panelih se zelo razlikuje glede na specifičen fenotip, ki ga opredeljujemo. Tako so pri panelu za ugotavljanje družinske hiperholesterolemije običajno prisotni le 4 geni, pri zmanjšani intelektualni sposobnosti brez pridruženih patognomoničnih značilnosti pa več kot 1000 genov (32). Bolj obsežna sta sekvenciranje eksonov in sekvenciranje celotnega genoma, ki se pogosto uporabljata po predhodno negativnem rezultatu sekvenciranja izbranega panela genov in pri kompleksnih fenotipih. Pri sekvenciranju eksonov določimo vse gene v kodirajočih regijah, pri tem je lahko analiza omejena na gene, ki so znano povezani z boleznimi pri človeku (klinični eksom ali Mendelium). Sekvenciranje celotnega genoma pa ni usmerjeno in vsebuje tako kodirajoče regije, kot tudi intronska in intergenska področja. Pred- »

nosti in slabosti posameznega sekvenciranja so povezane z obsegom preiskave. Tarčno sekvenciranje omogoča globlje sekvenciranje tarčnih regij, poleg tega je povezano z nižjimi stroški, v primeru, da so tarčni geni maloštevilni. Na drugi strani pa s tarčnim sekvenciranjem ne moremo odkriti novih genov, povezanih s fenotipom, kar je prednost sekvenciranja eksonov in celotnega genoma. Sekvenciranje eksonov in celotnega genoma je povezano z višjimi stroški (32). NGS ima še nekaj pomanjkljivosti. Analitska občutljivost NGS za detekcijo SNP je 5–10 %, kar je dovolj visoka občutljivost za zaznavanje večino podedovanih bolezni, razen nizke ravni mozaicizma. Sekvenciranje nekaterih regij, kot so homologne, ponavljajoče in GC-bogate regije je težavno, saj zaradi podobnosti med njimi razlikovanje ni možno, še predvsem pri sekvenciranju krajših odsekov. Interpretacija je zaradi ogromnega števila podatkov izjemno zahtevna, saj pomen variant v intronskih in regijah, ki se ne prepisujejo, pogosto ni znan. Zahtevna pa je tudi interpretacija red-

kih oz. novih genetskih sprememb. Izjemnega pomena so zato podatkovne baze in tudi članki, ki opisujejo posamezne variante in njihovo povezavo s fenotipom. Kljub vsemu se še vedno zgodi, da varianti ni mogoče pripisati pomena. Nenazadnje, NGS ni vedno najprimernejši pristop za detekcijo strukturnih preureditev in CNV-jev (34). Trenutno se NGS uporablja za genetsko opredelitev vzroka različnih genetskih bolezni in je ključen del diagnostične obravnave, ki pogosto omogoča opustitev bolj invazivnih metod, kot sta biopsija jeter in lumbalna punkcija, ki sta bili včasih ključni za diagnozo bolezni, pri katerih so prisotne nepravilnosti jetrnih encimov ali nevrottransmitterjev. Na področju presejanja novorojencev za prirojene bolezni presnove se NGS večinoma uporablja kot potrditvena tehnika (22). Razvoj je usmerjen proti možnostim uporabe NGS kot primarnega metodološkega pristopa v presejanju novorojencev, za kar pa trenutno obstajajo še nekateri etični in metodološki zadržki (35, 36).

ZAKLJUČEK

Laboratorijska diagnostika v pediatriji je zahtevnejša kot laboratorijska diagnostika pri odrasli populaciji, saj zaradi rasti in razvoja prihaja do številnih sprememb, ki se odražajo tudi v spremembah koncentracij analitov. Izrednega pomena je tesno sodelovanje laboratorijskega osebja z zdravniki pri naročanju preiskav in interpretaciji rezulta-

tov ter oblikovanju protokolov diagnostike bolezenskega stanja in spremljanja zdravljenja. Tehnološki razvoj je v zadnjih letih omogočil velik napredek pri lažjem analizi-ranju vzorcev predvsem z vidika majhnih volumnov. Kljub temu veliko izzivov ostaja, predvsem na področju predanalitike in interpretacije rezultatov (4).

LITERATURA

1. Coffin CM, Hamilton MS, Pysher TJ, Bach P, Ashwood E, Schweiger J, et al. Pediatric laboratory medicine: current challenges and future opportunities. *Am J Clin Pathol.* 2002;117(5):683–90.
2. Kržišnik C, Breclj Anderluh M, Omersel Vujić E, Derganc M, Čizman M, Konjajev Z, et al. *Pediatrija*. 1. izd. DZS; 2014.
3. Bishop ML, Schoeff LE, Fody EP. *Clinical chemistry: Principles, techniques, correlations*. 7th ed. Wolters Kluwer | Lippincott Williams & Wilkins; 2013. 720 p.
4. Jones PM, Dietzen DJ, Haymond S, Bennett MJ. *Pediatric laboratory medicine*. 1st ed. McGraw Hill; 2017.
5. WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy [Internet]. Dostopno na: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/268790/WHO-guidelines-on-drawing-blood-best-practices-in-phlebotomy-Eng.pdf?ua=1
6. Božnar Alič E, Trampuš Bakija A. Priporočeni postopek za odvzem kapilarne krvi. 2. izd. Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM); 2020.
7. Sztefko K, Beba J, Mamica K, Tomasik P. Blood loss from laboratory diagnostic tests in children. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(8):1623–6.
8. Jakacka N, Snarski E, Mekuria S. Prevention of iatrogenic anemia in critical and neonatal care. *Adv Clin Exp Med.* 2016;25(1):191–7.
9. Howie SRC. Blood sample volumes in child health research: review of safe limits. *Bull World Health Organ.* 2011;89(1):46–53.
10. Burtis C. Sample evaporation and its impact on the operating performance of an automated selective-access analytical system. *Clin Chem.* 1990;36(3):544–6.
11. Diviney J, Jaswon MS. Urine collection methods and dipstick testing in non-toilet-trained children. *Pediatr Nephrol.* 2020.

12. Prezelj M, Bratož S. Priporočila za organiziranje in izvajanje laboratorijskih testov ob pacientu. 1. izd. Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM); 2014.
13. Kohse KP. National and international initiatives and approaches for the establishment of reference intervals in pediatric laboratory medicine. *J Lab Med.* 2015;39(4):197–212
14. Hay W, Levin M, Abzug M, Bunik M, editors. *Current Diagnosis & Treatment: Pediatrics.* 25th ed. McGraw Hill; 2020.
15. Adeli K, Higgins V, Trajceviski K, White-Al Habeeb N. The Canadian laboratory initiative on pediatric reference intervals: A CALIPER white paper. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2017;54(6):358–413.
16. Ridefelt P. NORICHILD – nordiskt projekt för referensintervall för barn. *Klinisk Biokemi i Norden.* 2006;18:42.
17. Kohse KP. KiGGS - The German survey on children's health as data base for reference intervals and beyond. *Clin Biochem.* 2014;47(9):742–3.
18. National Children's Study (NCS) Vanguard Data Repository [Internet]. Dostopno na: <https://dash.nichd.nih.gov/study/228954>
19. Horowitz GL, Altaie S, Boyd JC, Ceriotti F, Garg U, Horn P, et al. Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline. 3rd ed. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*; 2010.
20. Lisyová J, Chandoga J, Jungová P, Repický M, Knapková M, Machková M, et al. An unusually high frequency of SCAD deficiency caused by two pathogenic variants in the ACADS gene and its relationship to the ethnic structure in Slovakia. *BMC Med Genet.* 2018;19(1):64.
21. Fernandez-Lainez C, Aguilar-Lemus JJ, Vela-Amieva M, Ibarra-Gonzalez I. Tandem mass spectrometry newborn screening for inborn errors of intermediary metabolism: abnormal profile interpretation. *Curr Med Chem.* 2012;19(26):4511–22.
22. Repič Lampret B, Remec ŽI, Drole Torkar A, Žerjav Tanšek M, Šmon A, Koračin V, et al. Expanded newborn screening program in Slovenia using tandem mass spectrometry and confirmatory next generation sequencing genetic testing. *Zdr Varst.* 2020;59(4):256–63.
23. Wright CF, FitzPatrick DR, Firth HV. Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. *Nat Rev Genet.* 2018;19(5):253–68.
24. Lalonde E, Rentas S, Lin F, Dulik MC, Skraban CM, Spinner NB. Genomic diagnosis for pediatric disorders: revolution and evolution. *Front Pediatr.* 2020;8:373.
25. Ezgu F. Inborn errors of metabolism. *Adv Clin Chem.* 2016;73:195–250.
26. Phipps WS, Jones PM, Patel K. Amino and organic acid analysis: essential tools in the diagnosis of inborn errors of metabolism. *Adv Clin Chem.* 2019;92:59–103.
27. Valayannopoulos V, Poll-The BT. Diagnostic work-up in acute conditions of inborn errors of metabolism and storage diseases. *Handb Clin Neurol.* 2013;113:1553–62.
28. Dietzen DJ, Rinaldo P, Whitley RJ, Rhead WJ, Hannon WH, Garg UC, et al. National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: follow-up testing for metabolic disease identified by expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2009;55(9):1615–26.
29. Repič Lampret B. Personalizirana stopenjska laboratorijska diagnostika vrojenih boleznih presnove. *Laboratorijska medicina.* 2019;1:14–16.
30. Slavec L, Geršak K, Karas Kuželički N, Trebušak Podkrajšek K. Humane genske spremembe in njihovo določanje: trenutno stanje in obeti za prihodnost. *Slov Pediatr.* 2020;27(4):163–71.
31. Lovrecic L, Peterlin B. Uporaba molekularne kariotipizacije v klinični genetiki. *Zdrav Vestn.* 2013;82(10):669–76.
32. Narayanan DL, Girisha KM. Genomic testing for diagnosis of genetic disorders in children: chromosomal microarray and next-generation sequencing. *Indian Pediatr.* 2020;57(6):549–54.
33. Adams DR, Eng CM. Next-generation sequencing to diagnose suspected genetic disorders. *N Engl J Med.* 2018;379(14):1353–62.
34. Yohe S, Thyagarajan B. Review of clinical next-generation sequencing. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141(11):1544–57.
35. Lantos JD. Ethical and psychosocial issues in whole genome sequencing (WGS) for newborns. *Pediatrics.* 2019;143(Suppl 1):S1–S5.
36. Trier C, Fournous G, Strand JM, Stray-Pedersen A, Pettersen RD, Rowe AD. Next-generation sequencing of newborn screening genes: the accuracy of short-read mapping. *NPJ Genom Med.* 2020;5:36.