

Suchá krevní skvrna

(Suchá krevní kapka, Dried Blood Spot)



- Kapka kapilární krve (z prstu, ušního lalůčku nebo v případě novorozenců z patičky), je nanesena na testovací kartičku filtračního papíru a vysušena
 - odběrová kartička ze speciálního filtračního papíru (např. Whatman 903, Schleicher & Schuell...) s definovanými vlastnostmi
- Ze suché krevní kapky se vyrábí terčík (nejlépe ze středu skvrny), ze kterého se krev může vyextrahovat vhodným rozpouštědlem nebo puřím a extrakt lze použít k analýze



Provedení odběru kapky na screeningovou kartičku

- Odběr se provádí z prstu, ušního lalůčku nebo v případě novorozenců z patičky
- V místě odběru (dobře prokrveném, očištěném alkoholem a suchém) se provede se drobná incize, první kapka krve se setře suchým sterilním tamponem
- Po vytvoření dostatečně velké další kapky se jemně přiloží filtrační papírek screeningové kartičky, tak aby nasátá krev zcela zaplnila předtištěný terčík a filtrační papír byl viditelně nasáklý z obou stran
- Oblast kolem místa vpichu se nesmí mačkat či ždímat, aby nedošlo k příměsi tkáňového moku
- Terčík musí být nasáknutý najednou z jedné kapky, nesmí se vrstvit kapky do jednoho terčíku
- Je nutné zabránit kontaminaci papírku i skvrny
- Skvrny se nechají zaschnout v horizontální poloze kartičky pouze při pokojové teplotě
- Po zaschnutí se kapky překryjí krycím papírkem, který je součástí kartičky, a s vyplněnými údaji pacienta se posílají do laboratoře



Suchá krevní skvrna

+++

- je méně invazivní, odebírají se malé objemy (10 až 100 μ l) - šetrnější k pacientovi, vhodná zvláště pro odběry novorozenců
- po usušení skvrny jsou krevní vzorky stabilní (inaktivace enzymů ve vzorku, analyty jsou pouze po krátkou dobu v roztoku). Vzorky není třeba mrazit, lze je snadno dlouhodobě uchovávat při laboratorní teplotě a některá stanovení provádět z archivovaných vzorků i po letech (DNA)
- Snadná a bezpečná manipulace se vzorky, nízké riziko práce s infekčním materiálem. Suché vzorky je možné přepravovat poštou

- malé množství materiálu - pro analýzu nutné velmi citlivé metody: MS-MS, DELFIA, polymerázová řetězová reakce při analýze DNA
- Časově náročnější zpracování ve srovnání s analýzou kapalného materiálu díky nutnosti vyrážení terčíku a jeho extrakci - neumožňuje plnou automatizaci celého procesu
- Hodnoty získané analýzou krevní plazmy a krevní skvrny nemusí být zcela srovnatelné v důsledku odlišné matrice vzorku (matematické korekce, které se snaží vliv odlišné matrice eliminovat, nemusí vždy přinášet vyhovující výsledky)
- Příměsi z filtračního papíru
- Nehomogenita krevní skvrny

Využití techniky suché krevní skvrny:

- novorozenecký screening dědičných poruch metabolismu a endokrinních onemocnění
 - stanovení hormonů, lipidů, glykovaného hemoglobinu,...
 - stanovení léků a jejich metabolitů (farmaceutický průmysl - farmakokinetické a toxikokinetické preklinické studie) – technika LC/MS/MS
 - mikrobiologie, serologie (epidemiologické studie, vyhledávání HIV- pozitivních pacientů, hepatitida, cytomegalovirové infekce...)
 - molekulárně genetická vyšetření mutací
- Technika suché krevní skvrny se stala ideálním řešením pro zavedení celoplošného **novorozeneckého screeningu** a v této oblasti je naprosto nezastupitelná.

Novorozenecký screening



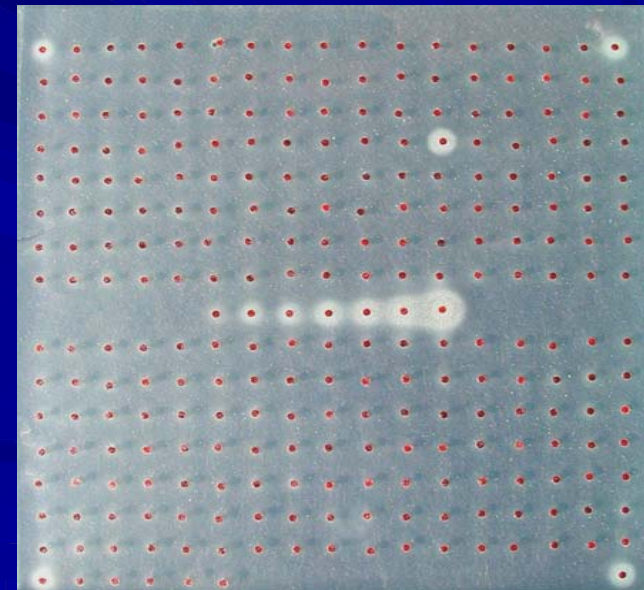
- aktivní a celoplošné (=celostátní) vyhledávání novorozenců se zvýšeným rizikem některých vzácných onemocnění. Screening umožní u novorozenců provést včasnou diagnostiku v období, kdy klinické příznaky ještě nejsou zjevné, a zajistit tak včasnou léčbu dříve, než onemocnění způsobí nevratné poškození.
- Krev se odebírá za definovaných podmínek všem novorozencům ve věku 48-72 hodin po narození a stanovují se v ní koncentrace látek specifických pro vyhledávané choroby, eventuelně se provádí i průkaz genové mutace

Informační webový portál o NS:

<http://www.novorozeneckyscreening.cz/index.php>

Historie

- 1963 - poprvé použita metoda suché krevní skvrny pro screening metabolických poruch ve velkých populacích novorozenců - prof. Guthrie (USA)
- **Guthrieho bakteriální inhibiční analýza:** jednoduchá, levná a spolehlivá metoda pro novorozenecký screening fenylketonurie
(dědičná porucha metabolismu fenylalaninu, při které dochází k jeho patologickému hromadění v krvi a ostatních tělních tekutinách. Hyperfenylalaninémie poškozuje CNS dítěte a vede k těžké oligofrenii).
- Metoda je založená na stimulačním efektu, který má aminokyselina fenylalanin na růst bakterie *Bacillus subtilis*. Po umístění terčiku suché krevní skvrny na agar obsahující bakteriální spóry, se po inkubaci při 37°C hodnotí průměry růstových zón, které jsou úměrné koncentraci fenylalaninu ve vzorku.



Novorozenecký screening

- S vývojem citlivých analytických technik (DELFI, tandemová hmotnostní spektrometrie) se rozšiřuje počet onemocnění, které lze diagnostikovat ze suché krevní skvrny

- spektrum vyšetřovaných metod se v různých zemích liší, záleží na incidenci choroby v dané populaci a na ekonomických podmínkách

- Novorozenecký screening v ČR

1975 – celoplošný novorozenecký screening fenylketonurie

od 2009 – 13 chorob

- kongenitální hypotyreóza - vrozená snížená funkce štítné žlázy
- kongenitální adrenální hyperplazie - vrozená nedostatečnost tvorby hormonů nadledvin
- cystická fibróza - vrozená porucha tvorby hlenu dýchacích cest
- 10 různých dědičných poruch metabolismu aminokyselin (př. fenylketonurie) a mastných kyselin