

# Suchá krevní skvrna

## (Suchá krevní kapka, Dried Blood Spot)



- Kapka kapilární krve nanesená na testovací kartičku filtračního papíru a vysušena
  - odběr z prstu
  - ušního lalůčku
  - z patičky (u novorozenců)
  - odběrová kartička ze speciálního filtračního papíru (např. Whatman 903, Schleicher & Schuell...) s definovanými vlastnostmi
- vyražení terčíku ze suché krevní kapky
  - nejlépe ze středu skvrny
- vyextrahování krve z terčíku vhodným rozpouštědlem nebo pufrem
- použití extraktu k analýze



# Provedení odběru kapky na screeningovou kartičku

- odběr z prstu, ušního lalůčku nebo v případě novorozenců z patičky
- drobná incize v místě odběru (dobře prokrveném, očištěném alkoholem a suchém)
- první kapka krve setřena suchým sterilním tamponem
- další kapka nasáta do screeningové kartičky tak, aby filtrační papír byl viditelně nasáklý z obou stran
- nutno zabránit příměsi tkáňového moku, kontaminaci papírku i skvrny, vrstvení více kapek
- sušení skvrn v horizontální poloze kartičky při pokojové teplotě
- překrytí suché kapky krycím papírkem (součást kartičky), vyplnění údajů pacienta, odeslání do laboratoře



# Suchá krevní skvrna

+++

- méně invazivní, odběr malého objemu (10 až 100  $\mu$ l) - šetrnější k pacientovi, vhodná zvláště pro odběry novorozenců
- po usušení skvrny - 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 (možno 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 vyražení 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 - ideálním řešením pro zavedení celoplošného **novorozeneckého screeningu** a v této oblasti naprosto nezastupitelná

# Novorozenecký screening



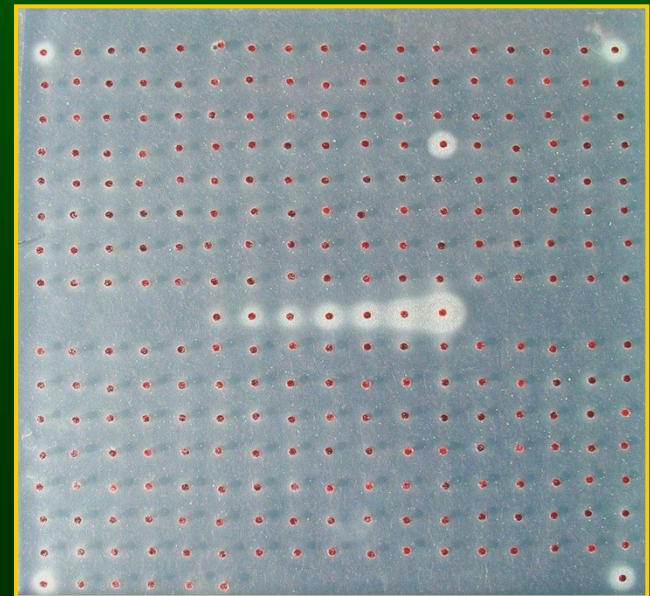
- aktivní a celoplošné (=celostátní) vyhledávání novorozenců se zvýšeným rizikem některých vzácných onemocnění
- umožní u novorozenců provést včasnou diagnostiku v období, kdy klinické příznaky ještě nejsou zjevné, a zajistit tak včasnou léčbu dříve, než onemocnění způsobí nevratné poškození
- odběr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

Informační webový portál o NS:

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

# 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
      - patologické hromadění fenylalaninu v krvi a ostatních tělních tekutinách
      - hyperfenylalaninémie poškozuje CNS dítěte, vede k těžké oligofrenii
- Metoda založená na stimulačním efektu aminokyseliny fenylalaninu na růst bakterie *Bacillus subtilis*:
  - umístění terčíku suché krevní skvrny na agar obsahující bakteriální spóry
  - inkubace při 37°C
  - hodnocení průměrů růstových zón - 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

dnes – 18 chorob

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