

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



SAMOTESTIRANJE, HITRO TESTIRANJE ALI TESTIRANJE OB PREISKOVANCU?

strokovno izpopolnjevanje
s področja farmacije

Ljubljana, 15., 16. in 22. junij 2021

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



Strokovno izpopolnjevanje s področja farmacije

SAMOTESTIRANJE, HITRO TESTIRANJE ALI TESTIRANJE OB PREISKOVANCU?

Urednici

Jasna Omersel, Urška Nabergoj Makovec

SAMOTESTIRANJE, HITRO TESTIRANJE ALI TESTIRANJE OB PREISKOVANCU?

Urednici: asist. dr. Jasna Omersel, asist. dr. Urška Nabergoj Makovec

Recenzentke: izr. prof. Mojca Kerec Kos, doc. dr. Urška Pečar Fonović, asist. dr. Jasna Omersel, asist. dr. Urška Nabergoj Makovec

Avtorji: prof. dr. Joško Osredkar, prof. dr. Borut Božič, doc. dr. Nejc Horvat, asist. dr. Boštjan Martinc, asist. dr. Dunja Urbančič, asist. dr. Matjaž Ravnikar, Tina Kek, prof. dr. Ksenija Geršak, izr. prof. dr. Nataša Karas Kuželički

Oblikovanje: asist. dr. Urška Nabergoj Makovec

Grafično oblikovanje naslovnice: Nina Gašperlin, Zaya Kreativni Studio, www.zaya.si

Založila: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Vrst/vsebina: Elektronska izdaja. Tiskana verzija je enaka elektronski.

URL naslov: <http://www.ffa.uni-lj.si/knjiznica/e-knjige>

Kraj in leto izida: Ljubljana, 2021

Glavni namen knjige je podati aktualna strokovna spoznanja in poglede na samotestiranje, hitro testiranje ter testiranje ob preiskovancu. Kljub skrbnemu delu je lahko v knjigi ostala posamezna tiskarska napaka. Avtorji, recenzenti, urednika in založnik ne prevzemajo odgovornosti za škodo, ki bi nastala z uporabo te knjige.

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID 67170051

ISBN 978-961-6378-90-1 (PDF)

UVODNE BESEDE

Le nekaj mesecev po začetku epidemije covid-19 (2020) so trg preplavili hitri testi za določanje prisotnosti antigenov virusa SARS-CoV-2. Sledili so pozivi k množičnemu testiranju s hitrimi antigenimi testi za SARS-CoV-2 na javnih mestih, ki je v nekaterih evropskih državah prešlo tudi v samotestiranje. Javnost so preplavili izrazi samotestiranje, hitro testiranje, antigeni testi ipd. A hitri testi niso novost, temveč so že več desetletij prisotni v laboratorijski medicini. Izvajajo se izven medicinskih laboratorijev kot testiranje ob preiskovancu (t. i. point of care test – POCT), saj omogočajo hitro pridobljen rezultat, ki lahko neposredno vpliva na postavitev diagnoze, napoved zdravstvenega izida ali spremljanje zdravljenja. V tem primeru je POCT del laboratorijske medicine in ga je treba izvajati v skladu s predpisi in standardi v vzpostavljenem sistemu kakovosti, v katerega so vključeni tudi medicinski laboratoriji. Na voljo so številni hitri testi, na primer za določanje glukoze, elektrolitov, hormonov, plodnosti, protrombinskega časa, označevalcev srčnega infarkta, za odkrivanje alergij, intolerance na določeno hrano, infekcij ipd. V vedno večji meri so za namene storitev s POCT in/ali samotestiranja dostopni v fizičnih in spletnih lekarnah ter v specializiranih trgovinah z medicinskimi pripomočki. V zadnjih letih se je povečala tudi spletna dostopnost genskih testov, s katerimi lahko uporabnik identificira dejavnike tveganja za določeno bolezen, preveri neželene učinke zdravil in optimizira zdravljenje. Vedno večja dostopnost možnosti samotestiranja pa na drugi strani sproža vprašanja kakovosti in zanesljivosti rezultatov, kakšen je vpliv na uporabnika ter kakšna je nadaljnja strokovna podpora in s tem vloga farmacevtov in strokovnjakov laboratorijske medicine na tem področju.

V uvodnem predavanju letošnjega izobraževanja na Fakulteti za farmacijo bomo predstavili področje POCT kot del laboratorijske medicine, hkrati pa opredelili tudi pomen, dobrobiti in morebitne pasti samotestiranja za uporabnika. V nadaljevanju bomo predstavili trg in regulativo medicinskih pripomočkov, namenjenih testiranju ob preiskovancu in samotestiranju, ter kako so tovrstna testiranja že del lekarniških storitev po Evropi. Marsikatero takšno storitev najdemo tudi v slovenskih lekarnah, na primer v okviru programa farmacevtske skrbi na področju sladkorne bolezni. Predstavljena bo kot praktični primer storitve z uporabo hitrih testov za določanje glukoze in maščob v kapilarni krvi (POCT). V osrednji sklop vključujemo tudi predavanji na temo covid-19, na katerih vas bomo seznanili z novostmi testiranja in glavnimi lastnostmi trenutno dostopnih hitrih antigenih testov za SARS-CoV-2 ter odgovorili na nekaj strokovnih vprašanj, ki sejejo dvome v ustreznost in smiselnost takih testiranja. V zadnjem sklopu predavanj se bomo osredotočili na novosti – genske teste, ki so danes na enostaven način že dostopni širši javnosti. Predstavljena bosta primera nutrigenetike folatov in farmakogenetike nekaterih zdravilnih učinkovin. Rezultati teh testiranja lahko pomembno doprinesejo k boljšim zdravstvenim izidom.

V okviru izobraževanja želimo podati strokovno utemeljene odgovore na ključna vprašanja glede uporabe hitrih testov bodisi za samotestiranje ali trenutno aktualno množično testiranje. Obenem želimo med vas širiti novosti in kritičen pogled na številna nova testiranja, ki so pogosto le »klik stran« od uporabnika. Potrudili se bomo, da vam bodo informacije v pomoč pri vsakdanjem delu tako znotraj farmacevtsko-medicinske stroke kot tudi pri ozaveščanju širše javnosti.

asist. dr. Jasna Omersel

asist. dr. Urška Nabergoj Makovec

KAZALO

UVODNE BESEDE.....	3
KAZALO	5
HITRI TESTI ZA SAMOTESTIRANJE IN DIAGNOSTIKO OB PREISKOVANCU	7
Povzetek.....	7
Uvod.....	8
Testiranje ob preiskovancu	8
Samotestiranje	10
Preventiva in pomen uporabe hitrih testov	10
Presejanje	11
Zaključek.....	16
Literatura	17
TRG IN REGULATIVA MEDICINSKIH PRIPOMOČKOV, NAMENJENIH SAMOTESTIRANJU IN TESTIRANJU OB PREISKOVANCU	19
Povzetek.....	19
Uvod.....	20
Vrednotenja v laboratorijski medicini	21
Regulativa <i>in vitro</i> diagnostičnih medicinskih pripomočkov	23
Uredba o <i>in vitro</i> diagnostičnih medicinskih pripomočkih.....	24
Nadzor trga in obveze posameznih subjektov	29
Dodatne posebnosti samotestiranja in testiranja ob pacientu	30
Zaključek.....	31
Literatura	31
TESTI OB PREISKOVANCU - STORITEV V ZUNANJIH LEKARNAH.....	33
Povzetek.....	33
Uvod.....	34
Prednosti izvedbe testov ob preiskovancu v zunanjih lekarnah	35
Primeri testov ob preiskovancu.....	36
Razširjenost testov ob preiskovancu v evropi.....	37
Natančnost in točnost testov ob preiskovancu, izvedenih v zunanjih lekarnah	39
Vpliv izvedbe testov ob preiskovancu v zunanjih lekarnah na klinične izide	40
Izzivi izvedbe testov ob preiskovancu v zunanjih lekarnah	40
Zaključek.....	43
Literatura	43
SISTEMI ZA MERJENJE GLUKOZE IN MAŠČOB V KRVI.....	33
Povzetek.....	45
Uvod.....	46
Pomen spremljanja koncentracije glukoze v krvi s samotestiranjem.....	46
Sistemi za merjenje glukoze v kapilarni krvi.....	47
Kontinuirano spremljanje koncentracije glukoze	54
Spremljanje koncentracije maščob v krvi	56

Vloga lekarniških farmacevtov	57
Zaključek.....	58
Literatura	58
TESTIRANJE COVID-19: HITRI ANTIGENSKI TESTI IN NOVE METODE.....	61
Povzetek.....	61
Uvod.....	62
Določanje proteinov SARS-CoV-2.....	63
Določanje nukleinske kisline SARS-CoV-2.....	68
Serološki testi za določanje prebolele okužbe s SARS-CoV-2.....	70
Pomen biološkega vzorca.....	72
Zaključek.....	73
Literatura	73
TESTIRANJE COVID-19: ZMOTE IN RESNICE	75
Povzetek.....	75
Uvod.....	76
Dokazovanje mikroorganizmov z metodo PCR.....	76
Občutljivost, specifičnost ter manipulacija testov PCR.....	76
Pomen negativnega rezultata testa PCR.....	77
Delež pozitivnih vzorcev.....	78
Negativen test in prekinitev karantene.....	78
Vpliv brisa na krvno-možganska bariero.....	79
Lokalna občutljivost pri odvzemu brisa.....	80
Zanesljivost hitrih antigenih testov.....	80
Zaključek.....	81
Literatura	81
PRIHODNOST: NUTRIGENETSKI TESTI - PRIMER FOLATI	83
Povzetek.....	83
Uvod.....	83
Presnova folatov.....	85
Metiltetrahidrofolat reduktaza (MTHFR).....	87
Genetska obravnava in nutrigenetski testi.....	90
Priporočila.....	91
Zaključek.....	92
Literatura	93
PRIHODNOST: FARMAKOGENOMIKA ZDRAVIL	95
Povzetek.....	95
Uvod.....	96
Razvoj farmakogenetike in klinične smernice.....	96
Implementacija farmakogenomike v klinično prakso.....	98
Farmakogenetski testi – testiranje prek spleta.....	101
Zaključek.....	104
Literatura	105

HITRI TESTI ZA SAMOTESTIRANJE IN DIAGNOSTIKO OB PREISKOVANCU

prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; Katedra za klinično biokemijo;

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

POVZETEK

Laboratorijsko testiranje ob preiskovancu (POCT) je del laboratorijske medicine, kjer gre za preiskave biološkega materiala iz človeškega telesa, izvajane izven medicinskega laboratorija: v enotah za nujno medicinsko pomoč, na oddelkih z intenzivno terapijo, v operacijskih sobah, patronaži idr. Tovrstna testiranja so običajno enostavna za izvedbo, rezultat dobimo že v nekaj minutah, a vendar lahko s tem pomembno vplivamo na nadaljnje terapevtske odločitve. Še vedno velja, da je treba POCT izvajati v skladu s predpisi in standardi v vzpostavljenem sistemu kakovosti, kot sicer velja za medicinske laboratorije. Na drugi strani pa se zaradi relativno enostavne uporabe, želje uporabnikov in tudi za namene spremljanja določenih terapij ali bolezenskih stanj s hitrimi testi omogoča tudi samotestiranje, pri katerem preiskovanec testiranje izvede sam. Takšna dobro znana primera sta samokontrola in samovodenje diabetikov ter nadzor antikoagulantne terapije. Dostopnost testov za samotestiranje je vse večja. V tem kontekstu je zelo pomembno izobraževanje uporabnika o pravilni uporabi merilnikov oziroma testov, saj v primeru samotestiranja ne moremo vedeti, ali so bili postopki izvedeni po priporočilih proizvajalca, ki zagotavljajo pridobitev kakovostnih rezultatov.

1. UVOD

Bolezen je treba odkriti in zdraviti čim prej, saj je tako izid bolezni veliko uspešnejši. Vsak posameznik se sooča s pojmovanjem zdravja na svojstven način. Pomembna je skrb za fizično aktivnost, zdravo prehrano, sproščanje in da se ob opaženih spremembah na telesu takoj odpravimo na zdravniški pregled.

Preiskave bioloških vzorcev predstavljajo zelo pomemben del diagnostike, rezultati teh analiz pa zdravniku pomagajo pri postavitvi diagnoze ali pri nadzorovanju zdravljenja. Preiskave vzorcev večinoma izvajajo v medicinskih laboratorijih, del pa je takih, ki jih izvajajo tudi izven laboratorijev, pa naj bo to v ambulantah, enotah bolnišničnega okolja ali pa preiskovanci opravijo tak test sami (samotestiranje). Razvoj tehnologije različnih analiznih postopkov in njihova uporaba v prenosnih aparatih, predvsem pa uvedba čipov so omogočili, da se laboratorijsko testiranje v vedno večjem obsegu seli bliže pacientu.

2. TESTIRANJE OB PREISKOVANCU

Za tovrstno testiranje je v uporabi več izrazov (*Ancillary testing, Satellite testing Bedside testing, Near patient testing, Home testing, Self-management, Patient self-management, Remote testing, Physician's office laboratories*), največkrat pa je v rabi izraz POCT (*Point of Care Testing*). POCT je v skladu z definicijo vsako testiranje, izvedeno izven tradicionalnega medicinskega laboratorija, rezultat pa lahko vpliva na takojšnjo spremembo pacientove oskrbe (1, 2).

Laboratorijsko testiranje ob pacientu uvajamo z namenom takojšnje razpoložljivosti rezultata analize biološkega vzorca za terapevtsko odločitev, ker bi v času, ki ga potrebuje laboratorij za rezultat, lahko bilo ogroženo pacientovo zdravje. To je še zlasti pomembno v enotah za nujno medicinsko pomoč, oddelkih z intenzivno terapijo, operacijskih sobah, specialnih klinikah, intervencijskih enotah.

S priročnimi aparati lahko ob pacientu opravljamo določanje glukoze, hemoglobina, CRP (C-reaktivni protein), holesterola, nekaterih zdravil, označevalcev za bolezni srca, koagulacijskih testov, osnovno analizo urina: Uporabljajo jih tudi v mikrobiologiji za določanje streptokoka skupine A, infekcijske mononukleoze, *Helicobacter pylori*, virusa influence.

Zaradi številnih prednosti testiranja ob pacientu je sodoben razvoj usmerjen predvsem v razširitev spektra testov in v izboljšave majhnih aparatov, enostavnih za uporabo, ki imajo omejeno analitično sposobnost, ne zahtevajo veliko laboratorijskega znanja, so robustni ter s tem neobčutljivi na neobvladljive vplive in motnje.

2.1. Sistem zagotavljanja kakovosti

POCT je del laboratorijske dejavnosti, za katero veljajo enake zahteve kakovosti kot za medicinske laboratorije. POCT je treba izvajati v skladu s predpisi in standardi v vzpostavljenem sistemu kakovosti. Sistem kakovosti obsega organizacijo področja, izbiro aparata in verifikacijo njegovega delovanja, usposabljanje izvajalcev, testiranje oz. meritve, kontrole kakovosti in beleženje rezultatov. Odgovornosti izvajalcev in sistem nadzora morajo biti jasno opredeljeni.

Odgovornost za uvedbo in nadzor nad POCT ima v ožjem strokovnem pogledu medicinski laboratorij z dovoljenjem za delo oziroma specialist ustrezne laboratorijske stroke, in to ne glede, ali izvajamo POCT v bolnišnicah, zdravstvenih domovih, zdravniških ambulantah, mobilnih zdravstvenih enotah, lekarnah, patronaži, idr.. Osebe, ki lahko izvaja teste, mora biti za to delo usposobljeno, lahko je laboratorijsko ali nelaboratorijsko, znanje pa je treba redno dopolnjevati in preverjati. Čeprav je večina pripomočkov razmeroma enostavnih, je ravnanje z nekaterimi aparaturami za POCT zmerno zahtevno.

Cilj vsake analize oziroma testiranja je pravočasen in pravilen rezultat, ki ga zagotovimo z obvladovanjem in nadzorom vseh korakov, ne samo v fazi analitike, ampak tudi v postopku pred samo analizo in po njej. Vsak korak mora biti v delovnem postopku oziroma navodilih napisan na enostaven in razumljiv način. S kontrolo kakovosti preverimo stabilnost in ponovljivost aparata ter s tem točnost rezultata testa pacientovega vzorca. Splošno pravilo narekuje izvajanje kontrole kakovosti z vsaj enim kontrolnim vzorcem na vsakem aparatu vsak dan pred začetkom testiranja vzorcev pacientov. Kontrolni vzorec analiziramo tudi vedno pri uporabi nove serije reagentov, po servisnem ali vzdrževalnem posegu na aparatu ali če je dobljeni rezultat vprašljiv glede na klinično sliko.

Enostavni merilniki POCT imajo pomanjkljivost v tem, da je treba vse podatke, tako rezultat testa, podatke o materialu, sporočanje rezultata in komentarje, zabeležiti ali vnesti ročno, kar pa ni samo časovno zamudno, ampak obstaja tudi možnost, da pride do napake, ko oseba, ki vnaša, prezre, doda ali spremeni pomemben podatek. Razvoj informacijske tehnologije je omogočil, da se je tudi dejavnost POCT povezala v informacijske sisteme. Optimalna informacijska rešitev je, da je sistem povezan tudi z laboratorijskim in bolnišničnim informacijskim sistemom, saj s tem dosežemo celovito obravnavo in transparentnost podatkov.

3. SAMOTESTIRANJE

Seveda pa je posebno področje uporabe testov POC tisto, ko teste izvedemo sami, zunaj zdravstvenih prostorov, doma. Največkrat gre za široko uporabo za spremljanje koncentracije glukoze pri sladkornih bolnikih, za nadzor antikoagulantne terapije, spremljanje koncentracije holesterola na eni strani, na drugi strani pa teste nosečnosti, plodnosti, idr.. Testi POC se razlikujejo tudi po tem, ali rezultat odčita merilnik ali pa gre za vizualno odčitavanje. V primeru merilnikov imamo prisotno stopnjo kontrole, s katero mora biti uporabnik seznanjen. Temu v zadnjem času v velikem obsegu lahko dodamo teste za ugotavljanje okužbe s SARS-CoV-2, pa naj gre za določanje samega antigena ali pa za določanje protiteles.

V primerih, ko preiskovanec sam izvaja testiranje, seveda ne moremo vedeti, ali so bili postopki izvedeni po priporočilih proizvajalca. Pri samokontroli in samovodenju diabetikov, vodenju antiokagulantne terapije je to že dolgo utečen protokol in preiskovanci lahko dobijo potrebne informacije v referenčnih ambulantah ali v lekarni.

4. PREVENTIVA IN POMEN UPORABE HITRIH TESTOV

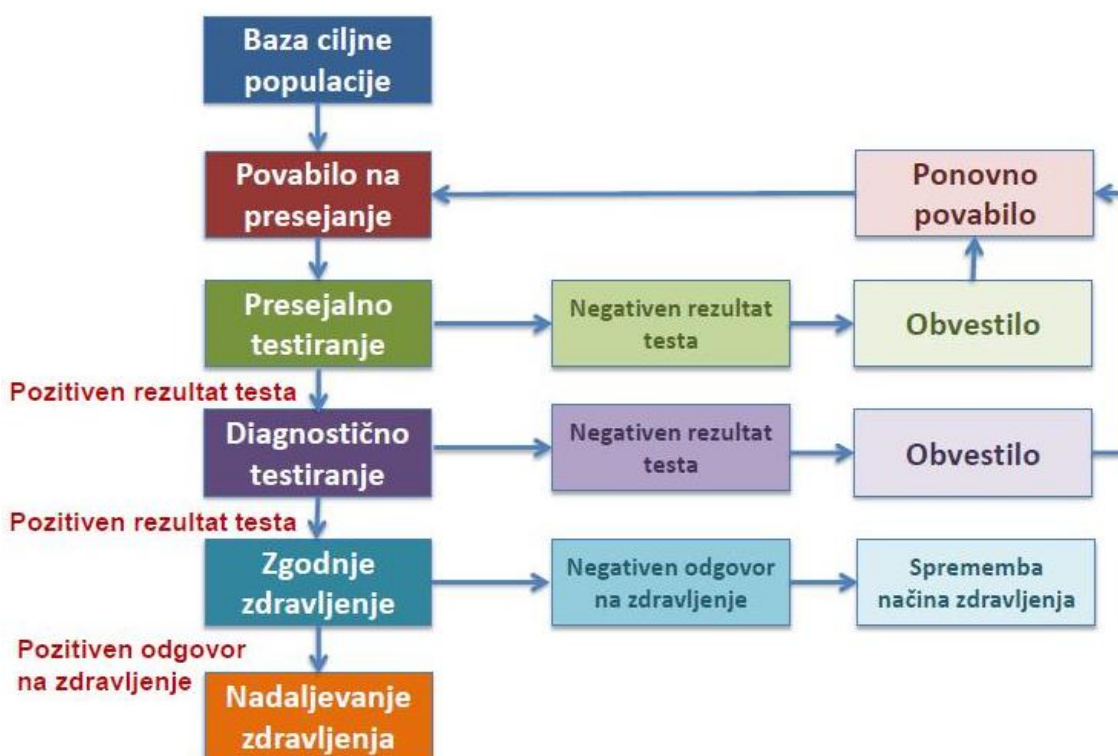
Ravni preventive bolezni se delijo na:

- **primarno-primarno** (preprečevanje okoliščin, ki pripomorejo k nastanku bolezni in zdravje ohranjajo oz. krepijo – zniževanje incidence bolezni),
- **primarno** (preprečevanje nastanka predklinične oblike bolezni z mehanizmi specifičnih oblik bioloških, prehranskih ali okoljskih ukrepov, z namenom, da bi obvarovali posameznika pred točno določenimi boleznimi, stanji pomanjkanja, poškodbami ipd.),
- **sekundarno** (preprečevanje nastanka klinično izražene oblike bolezni z iskanjem zgodnjih znakov bolezni v njenem predkliničnem obdobju, ko simptomi pri bolnem človeku še niso izraženi – asimptomatsko obdobje). V tem okviru lahko ukrepamo z **individualnim odkrivanjem prisotnosti bolezni** (*ang. case finding*) ali s **presejanjem** (*ang. screening*).
- **terciarno** (preprečevanje ali vsaj zmanjševanje telesnih, duševnih in socialnih posledic že izražene bolezni z namenom, da bi vzpostavili stanje, kot je bilo pred začetkom bolezni ali čim bližje prvotnemu stanju, oz. da bi posledice bolezni čim bolj omilili in ohranili posamezniku čim višjo stopnjo sposobnosti samostojnega življenja in funkcioniranja v skupnosti) (2).

5. PRESEJANJE

Presejanje je pregledovanje navidezno zdravih ljudi brez kliničnih znakov bolezni s preprostimi preiskavami ali testi z namenom odkritja tistih posameznikov z določeno stopnjo bolezni. Nadaljnje diagnostične preiskave so potrebne pri posameznikih, pri katerih se pokaže sum na bolezen. Presejanje uvedemo v primeru, ko je bolezen pomemben javnozdravstveni problem in je na voljo ustrezna preiskava (Slika 1). Učinek presejanja se pokaže, če je vključen v program vsaj 70-odstotni delež ljudi v tistih starostnih skupinah, kjer incidenca presega 100/100.000 (3). Učinek z vidika javnega zdravstva je večji pri organiziranemu presejanju kot pri oportunističnemu presejanju (na lastno pobudo ljudi ali zdravnikov).

5.1. Proces presejanja



Slika 1: Proces presejanja.

5.2. Cilji presejanja

Cilji presejanja so naslednji:

- znižanje incidence ali pojavnosti bolezni,
- znižanje pogostosti hudih zapletov bolezni,
- znižanje umrljivosti pri visoko smrtnih boleznih,
- zvišanje popolne ozdravljivosti bolezni.

5.3. Vrste presejanj

Presejanje delimo glede na:

- Organiziranost: organizirano/oportunistično;
- Obsežnost: množično/ogrožene skupine;
- Število bolezni, za katere presejamo naenkrat: enkratno/večkratno.

5.4. Klasična merila za oceno primernosti presejanja (4,5)

- Bolezen je pomemben javnozdravstveni problem (visoka incidenca in/ali umrljivost).
- Znan je naravni potek bolezni – bolezen mora imeti tako predklinično fazo, da jo je mogoče odkriti.
- Presejalna preiskava mora biti cenovno ugodna, preprosta, veljavna in sprejemljiva za uporabnike.
- Stroški testa morajo biti ustrezno nizki in morajo biti skupaj s stroški zdravljenja odkritih sprememb nižji od stroškov zdravljenja napredovale bolezni.
- Presejanje bo na populacijski ravni zmanjšalo incidenco in/ali umrljivost.
- Zdravljenje mora biti uspešno – z zgodnjo diagnostiko in zdravljenjem je možno izboljšati izid bolezni.
- Na voljo mora biti dovolj opreme in osebja za diagnostiko pri presejanju odkritih sprememb in za njihovo zdravljenje.

5.5. Revidirana merila za oceno primernosti presejanja (4,5)

- Presejalni program bi se moral odzvati na prepoznano potrebo.
- Cilje pregleda je treba opredeliti na začetku.
- Opredeljena mora biti ciljna populacija.
- Znanstveni dokazi o učinkovitosti programa presejanja.
- Program mora vključevati izobraževanje, testiranje, klinične storitve in upravljanje programa.
- Obstajati mora sistem za zagotavljanje kakovosti z mehanizmi za zmanjšanje morebitnih tveganj presejanja.

- Program mora zagotoviti možnost izbire, zaupnost in spoštovanje avtonomije.
- Program mora spodbujati enakost dostopa do pregleda za celotno ciljno populacijo.
- Vrednotenje programa je treba načrtovati od samega začetka.
- Splošne koristi presejanja morajo odtehtati škodo.

5.6. Veljavnost presejalnega testa

Veljavnost presejalnega testa pove, kako dobro posamezen test pravilno določi bolne in zdrave. Opredeljena je z občutljivostjo in specifičnostjo (Slika 2).

		Bolezen	
		<i>prisotna</i>	<i>odsotna</i>
Presejalni test	<i>pozitiven</i>	A pravilno pozitiven	B napačno pozitiven
	<i>negativen</i>	C napačno negativen	D pravilno negativen

Slika 2: Veljavnost presejalnega testa.

Občutljivost (senzitivnost) pove, kako dobro pozitivni rezultat testa napove dejansko bolne. Delež pozitivnih na testu med dejansko bolnimi. Test z visoko občutljivostjo bo pokazal malo napačno negativnih izvidov.

$$\text{občutljivost} = \frac{A}{A + C}$$

Specifičnost pove, kako dobro negativni rezultat testa napove dejansko zdrave. Delež negativnih na testu med dejansko zdravimi. Test z visoko specifičnostjo bo pokazal malo napačno pozitivnih izvidov.

$$\text{specifičnost} = \frac{D}{B + D}$$

Posledice zmanjšanje občutljivosti ali specifičnosti so navedene v Preglednici 1.

Preglednica 1: Posledice lažno pozitivnega ali lažno negativnega rezultata testa na družbo/za uporabnika.

Posledice lažno pozitivnega rezultata	Posledice lažno negativnega rezultata
Celo 3–5 % je preveliko na populacijski ravni. Spremljanje, potencialna škoda, strah, nelagodje. Rast stroškov za nepotrebne preiskave.	Lažni občutek varnosti, zanemarjanje zgodnjih znakov bolezni. Možnost opustitve obdobjnega presejalnega testa v prihodnje. Nadaljevanje z nezdravim življenjskim slogom. Že ena sama oseba ima lahko tragične posledice. Ekonomске in pravne posledice.

5.7. Koristi in slabosti presejanja

Koristi organiziranega populacijskega presejanja:

- Izboljšanje prognoze bolezni, če je le-ta odkrita v zgodnji razvojni stopnji;
- Manj radikalno zdravljenje, ki omogoča ozdravitev z odkritjem bolezni v zgodnji razvojni stopnji;
- Prihranek denarja v primerjavi z zdravljenjem bolnikov z boleznijo, odkrito v razširjeni ali razsejani obliki;
- Zagotavljanje ponovnega vabljenja oziroma spremljanja tudi bolnikov z negativnim testom.

Pomanjkljivosti organiziranega populacijskega presejanja:

- Dolgotrajna obolevnost v primerih, kjer je prognoza bolezni nespremenjena;
- Prekomerno zdravljenje v primeru nejasnih bolezenskih sprememb;
- Finančni stroški;
- Lažno negativni rezultat testa, lažna pomiritev preiskovancev z rezultatom testa;
- Lažno pozitivni rezultat testa, strah pri preiskovancih;
- Tveganje zaradi testa samega.

5.8. Izvajalci organiziranih presejanj

Organizirana presejanja izvajajo visoko usposobljeni timi, v katerih so:

- osebni izbrani zdravniki,
- zdravniki specialisti javnega zdravja,
- zdravniki kliniki ustrezne stroke,
- drugi zdravstveni delavci,
- sodelavci nemedicinskih ved.

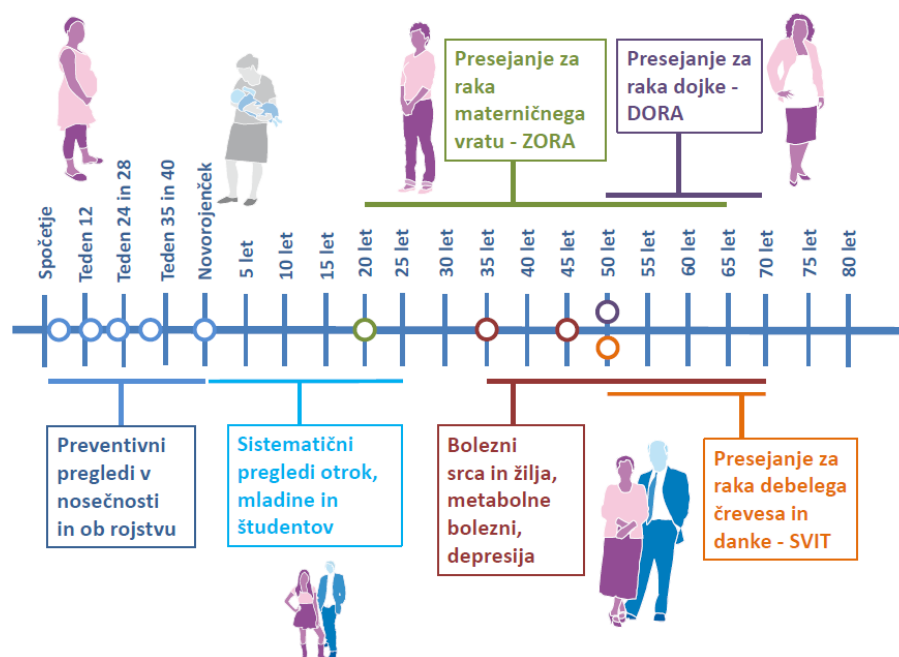
Podpora izvajanju presejanja:

- Timski pristop pri izvedbi posameznih korakov presejanja;
- Ustrezen podporni informacijski sistem;
- Ustrezno informiranje, opolnomočenje in vključevanje pacientov v odločitve o presejanju in zdravljenju;
- Evalvacija dela vključenih izvajalcev, kakovostno izvedeni postopki presejanja;
- Možnost koriščenja komunikacije po telefonu in elektronski pošti, povračilo stroškov izvedenega svetovanja;
- Komunikacijske veščine: izobraževanja izvajalcev presejanja;
- Promocijske aktivnosti.

5.9. Presejalni programi v Sloveniji

Presejalni programi, ki jih izvajamo v Sloveniji (Slika 3), so:

- Antenatalno obdobje: anemija, krvna skupna in Rh-faktor, serološke preiskave na toksoplazmozo, sifilis, hepatitis B, asimptomatska bakteriurija, UZ morfologija ploda, kromosomske abnormalnosti ob prisotnih dejavnikih tveganja, dejavniki tveganja za preeklampsijo in gestacijski diabetes ...;
- Neonatalno obdobje: splošno stanje novorojenčka, gestacijska starost, klinični in okvirni nevrološki pregled, preventiva hemoragične bolezni in neonatalne (gonoroične) oftalmije, odkrivanje fenilketonurije in kongenitalne hipotireoze, UZ kolkov, pregled sluha (TEOAE), ocena uspešnosti dojenja, idr.;
- Zdravstveno varstvo dojenčkov in otrok do 6. leta starosti;
- Zdravstveno varstvo šolskih otrok in mladine do dopolnjenega 19. leta;
- Zdravstveno varstvo študentov;
- Zdravstveno varstvo športnikov;
- Zdravstveno varstvo odraslih: nacionalni program primarne preventive bolezni srca in ožilja, diabetes, depresija, tvegano pitje alkohola, kajenje, KOPB, presejanje za raka materničnega vratu/raka dojk/raka debelega črevesa in danke.



Slika 3: Presejalni programi v Sloveniji (4,5).

6. ZAKLJUČEK

Aparat za določen test pogosto izbere in nabavi osebe, ki nima znanja in izkušenj na področju laboratorijske medicine in ne pozna zahtev za usposabljanje, dokumentiranje, ni pozorno na analizni postopek in ne ve, ali je izbira primerna. Rezultati, dobljeni z aparatom za POCT, morajo biti v bolnišničnem informacijskem sistemu sestavni del (integrirani) laboratorijskih rezultatov in morajo imeti oznako, da je rezultat dobljen ob pacientu. POCT ima pomembno vlogo pri zagotavljanju učinkovitosti zdravstvenih storitev, predvsem zaradi hitro dostopnega rezultata. Vendar to velja samo, če je rezultat točen in zanesljiv.

Organizirano presejanje predstavlja enega od najučinkovitejših sekundarno preventivnih ukrepov. Populacijsko presejanje je javnozdravstveni ukrep, ki se izvaja organizirano na določeni ciljni skupini ljudi. Učinek z vidika javnega zdravstva je večji pri organiziranem presejanju kot pri oportunističnem presejanju (na lastno pobudo ljudi ali zdravnikov). Organiziran program spremlja ustrezen nadzor kakovosti vseh postopkov, ki odpravlja ali vsaj omejuje tudi pomembne pomanjkljivosti presejanja, kot so napačno pozitivni in napačno negativni rezultati. Presejalni programi so nujni in investicija v ljudi, kar se odraža tako na nivoju vsakega posameznika kot tudi na globalnem nivoju. Bolezen je treba odkriti in zdraviti čim prej, saj je tako izid bolezni veliko uspešnejši.

LITERATURA

1. Prezelj M, Bratož S. Priporočila za organiziranje in izvajanje laboratorijskih testov ob pacientu (POCT - Point of Care Testing). Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM), 2014. 31 str. Zbirka Priporočeni postopki, št. 11.
2. Bratož S. POCT včeraj, danes, jutri : zakoni, standardi, priporočila. Laboratorijska medicina : znanstveno-strokovno glasilo Slovenskega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino. [Tiskana izd.]. 2019, št. 1, str. 80-81. ISSN 2670-4463.
3. Furlan D, Malavašič P. Dejavnost POCT včeraj, danes, jutri. Laboratorijska medicina : znanstveno-strokovno glasilo Slovenskega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino. [Tiskana izd.]. mar. 2019, [št.] 1, str. 72-74. ISSN 2670-4463.
4. Kos M., 2012. Obvladovanje zdravstvenih problemov prebivalstva. Fakulteta za farmacijo. www.sfd.si/modules/catalog/products/prodfile/fv_4_2012_copy1.pdf (30.4.2021)
5. Krajc M., Maučec Zakotnik J., Primic Žakelj M. Povzetek evropskih smernic za zagotavljanje kakovosti presejanja in diagnostike raka dojk, junij: 48-52. 2006. http://dora.onko-i.si/fileadmin/Dokumenti/smernice_1.pdf (30.4.2021)

TRG IN REGULATIVA MEDICINSKIH PRIPOMOČKOV, NAMENJENIH SAMOTESTIRANJU IN TESTIRANJU OB PREISKOVANCU

prof. dr. Borut Božič, mag. farm., EuSpLM
*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; Katedra za klinično biokemijo;
Univerzitetni klinični center Ljubljana, SPS Interna klinika, KO za revmatologijo*

POVZETEK

Regulativa medicinskih pripomočkov, namenjenih samotestiranju in testiranju ob preiskovancu/pacientu, je del celovite regulative *in vitro* medicinskih diagnostičnih pripomočkov. Za njihovo razvrščanje je pomemben predvideni namen, ki je opredeljen s podatki proizvajalca v navodilih za uporabo ali v oceni učinkovitosti. Smo v prehodnem obdobju uveljavljanja Uredbe (EU) o *in vitro* medicinskih pripomočkih, katere namen je zagotavljanje visokega varstva preiskovancev in nemoteno delovanje notranjega trga EU. V Uredbi so opredeljene obveze in odgovornosti posameznih subjektov, to je držav, proizvajalcev, uvoznikov, distributerjev, pooblaščenih predstavnikov in zdravstvenih ustanov. Za izvajanje testiranja ob pacientu pa je pomembna tudi specifična regulativa, to je nacionalni pravilnik o laboratorijski medicini in smernice za testiranje ob pacientu.

1. UVOD

Regulativa medicinskih pripomočkov za diagnostiko je enotna za celotno Evropsko skupnost (EU). Uredba EU iz leta 2017 s 5-letnim splošnim prehodnim obdobjem nadomešča Direktivo EU iz leta 1998 in ločuje medicinske pripomočke od *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkov. Zajeti so pripomočki za vse oblike testiranja v laboratorijski medicini – klasično laboratorijsko, ob pacientu in samotestiranje. Skupna jim je zahtevana kakovost *in vitro* diagnostičnega medicinskega pripomočka, razlike pa so v motivu, izvajalcih, lokaciji testiranja in nosilcu odgovornosti za rezultat.

Regulativo za neko področje oziroma dejavnost v veliki meri opredeljujejo motivi za izvajanje te dejavnosti. Čeprav so razlogi za testiranje na področju laboratorijske medicine različni, jih lahko povežemo v nekaj glavnih skupin (Preglednica 1). Najpogostejša sta preventivno ali kurativno ugotavljanje zdravstvenega stanja, vključno z odzivanjem na zdravila. To so osnovne dejavnosti medicinskih laboratorijev, ki potekajo večinoma v samem laboratoriju, deloma ob pacientu in v posebnih primerih kot samotestiranje. Naslednji razlog je radovednost posameznika. Ta tip preiskav je praviloma vezan na samoplačniško testiranje v laboratorijih ali na samotestiranje. Posebna skupina so testiranja, ki imajo pravno zavezujoče posledice, kot na primer odvzem vozniškega dovoljenja zaradi vožnje v alkoholiziranem stanju, premestitev na drugo delovno mesto zaradi zdravstvene nezmožnosti, omejitev gibanja po državi ali v državo zaradi na primer okužbe s covid-19, ugotavljanje sorodstvenih vezi v nekaterih sodnih postopkih. Ta testiranja izvajamo nadzorovano v laboratorijih ali izjemoma ob pacientu. Testiranja za namene reševanja raziskovalnih vprašanj potekajo v okviru bazičnih, aplikativnih in kliničnih raziskav, zapadejo pa še pod dodatno regulativo raziskovalnega dela v biomedicini.

Razlogi za testiranje so različni, prav tako so na prvi pogled tudi pričakovanja glede rezultatov različna. Od testiranja iz radovednosti pričakujemo pravilen rezultat. Od testiranja za namene zdravljenja pričakujemo pravo informacijo zdravniku za odločanje o postopkih in zdravilih. Od testiranja s pravnimi posledicami pričakujemo nedvoumen in nedvomen, torej zanesljiv rezultat za odločevalce.

Preglednica 1: Razlogi, pobudniki in izvajalci testiranja s področja laboratorijske medicine.

RAZLOG testiranja	Pobudnik testiranja	Izvajalec (osebje in lokacija)
Ugotavljanje zdr. stanja ob slabem počutju	Zdravnik na osnovi obiska pacienta	Laboratorijsko osebje (med. laboratorij) Nelaboratorijsko osebje (ob pacientu)
Kontrola odziva na terapijo	Zdravnik na osnovi predpisane terapije	Laboratorijsko osebje (med. laboratorij) Nelaboratorijsko osebje (ob pacientu) – med. sestra v bolnišnici, patronaža na domu Preiskovanec sam (samotestiranje)
Ugotavljanje zdr. stanja - preventivno	Delodajalec pred zaposlitvijo ali obdobjno	Laboratorijsko osebje (med. laboratorij)
Radovednost posameznika	Posameznik zase	Laboratorijsko osebje (med. laboratorij)
Testiranje s pravnimi posledicami	Delodajalec, upravni organ, policija	Laboratorijsko osebje (med. laboratorij) Nelaboratorijsko osebje (ob pacientu) – izjemoma
Odkrivanje novih znanj (raziskovalne študije)	Raziskovalne ali zdravstvene ustanove	Laboratorijsko osebje (med. laboratorij) in/ali raziskovalci – odvisno od tipa odobrene študije

2. VREDNOTENJA V LABORATORIJSKI MEDICINI

Za vrednotenje imamo vrsto strokovnih izhodišč, ki sicer ločujejo med laboratorijskim testiranjem, testiranjem ob pacientu in samotestiranjem, slonijo pa v vseh primerih na značilnostih metode, značilnostih analiznega kompleta in značilnostih rezultata (Preglednica 2). Vrednotenje metode ali analiznega postopka je s pristopi, parametri in terminologijo vezano na meroslovje (1). Pri vrednotenju rezultatov je pomembna klinična učinkovitost: ali lahko z njimi ločujemo med skupinami zdravih in bolnih ter med skupinami bolnih s podobnimi boleznimi. Specifičnost rezultata ali diagnostično/klinično specifičnost izrazimo kot delež zdravih, pri katerih je rezultat testa normalen, medtem ko diagnostična/klinična občutljivost predstavlja delež bolnikov s patološkim rezultatom. Klinična/diagnostična učinkovitost povezuje oba parametra (2). Vrednotenje analiznega kompleta je enako za uporabo v ročni ali avtomatizirani izvedbi, so pa dodatne zahteve, ko se analizni postopek in reagenti iz raziskovalne sfere selijo na področje diagnostike. Ko k vsemu navedenemu

priključimo še ekonomske, organizacijske, socialne in etične parametre testiranja, govorimo o vrednotenju preiskave kot ene od zdravstvenih tehnologij (3).

Preglednica 2: Najpogostejši parametri vrednotenja.

Vrednotenje metode	Vrednotenje rezultatov	Vrednotenje analiznega kompleta
Točnost (pravilnost)	Pozitivna napovedna vrednost	Praktičnost
Natančnost (ponovljivost)	Negativna napovedna vrednost	Uporabnost
Funkcijska odvisnost (linearnost)	Klinična/diagnostična občutljivost	Zanesljivost
Meja detekcije	Klinična/diagnostična specifičnost	Merilna negotovost
Analizna občutljivost	Klinična/diagnostična učinkovitost	
Analizna specifičnost	Verjetnostno razmerje	
Analizna učinkovitost		

Pri metodah na osnovi imunokemijske reakcije lahko zaradi heterogenosti pacientovih protiteles analizna specifičnost predstavlja težavo. Slednja vpliva tudi na vrednotenje rezultatov: imunski odziv sestavlja množica protiteles proti različnim mikrobnim antigenom in njihovim epitopom, na katere se vežejo protitelesa z različnimi afinitetami. Tako z različnimi izvedbami metod ne zajamemo vedno istih ali vseh podskupin protiteles in se zato lahko rezultati med seboj razlikujejo (4). Tako seveda ni vseeno, niti s katero metodo smo bili testirani niti s katerim analiznim kompletom ali reagenti niti kdo je izvedel testiranje. Še posebno, kadar je posledica rezultata testiranja uvedba agresivne terapije z npr. citostatiki, invaziven medicinski poseg, odvzem vozniškega dovoljenja, začasna ali stalna prepoved dela ali obvezna karantena. To je, poleg varnosti pacienta, eden od glavnih razlogov za obstoj regulative *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkov.

2.1. Nosilci odgovornosti testiranj

Čeprav sta v naslovu prispevka samo dve obliki testiranja (samotestiranje in testiranje ob preiskovancu), ne moremo mimo klasičnega testiranja v medicinskem laboratoriju, saj je ključno povezano s testiranjem ob pacientu, pa tudi s hitrim testiranjem. V vseh primerih se uporablja za testiranje izključno medicinske pripomočke, ki so registrirani za laboratorijsko diagnostiko, kar vključuje tudi pripomočke za samotestiranje. Na

trgu so namreč tudi analizni kompleti, namenjeni raziskovalnemu delu, ki pa niso ovrednoteni za diagnostiko. Poleg tega na svetovnem spletu najdemo komplete brez ustreznih oznak, brez validacije ali brez ovrednotenja rezultatov.

Pri odločitvi, za kakšen tip testiranja je nek *in vitro* diagnostični medicinski pripomoček ustrezen, je pomembno, kdo izvaja in nadzira samo preiskavo. Pri laboratorijskem testiranju je to strokovno izobraženo in usposobljeno laboratorijsko osebje, od laboratorijskega tehnika do specialista medicinske biokemije ali druge ustrezne laboratorijske smeri. Pogoji za delo so predpisani s Pravilnikom o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine (5). Testiranja ob pacientu opravlja zdravstveno, vendar ne nujno laboratorijsko osebje. Pogoji so predpisani z že omenjenim pravilnikom (5) in s smernicami za preiskave ob pacientu (6, 7). Samotestiranje izvede vsak posameznik sam, pri čemer je odločitev lahko osnovana na spremljanju terapije po nasvetu zdravnika ali pa na lastnem interesu brez vpletanja zdravstvenih delavcev. Tako so tudi odgovornosti za pravilnost postopka in zanesljivost rezultata v navedenih primerih različne. V primeru testiranja v laboratoriju je odgovorno laboratorijsko osebje z vodjem specialistom. Za testiranje ob pacientu je to nelaboratorijsko osebje, ki izvaja testiranje, in laboratorij, ki je odgovoren za vpeljavo in nadzor testiranja ob pacientu. V vseh teh primerih smejo izvajalci uporabljati samo metode in pripomočke, ki so preverjeni in registrirani za diagnostično uporabo, torej *in vitro* diagnostične medicinske pripomočke. Pri samotestiranju je nekoliko drugače, saj je odgovoren vsak posameznik zase. Pri spremljanju terapije po priporočilu zdravstvene stroke mora uporabiti registriran *in vitro* diagnostični medicinski pripomoček, saj lahko zdravnik le tako zaupa rezultatom. Pri samotestiranju po lastnem interesu pa posameznik ni vezan na formalno regulativo in lahko uporabi karkoli, vendar pa rezultati niso vedno prenosljivi v zdravstveni sistem. Pri tem nosi del odgovornosti tudi dobavitelj, saj posamezniku ni dovoljeno za samotestiranje dobaviti vseh tipov *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkov. Navedene odgovornosti vključujejo moralno, strokovno, odškodninsko in kazensko odgovornost. Ob toliko različnih nosilcih in širokem spektru odgovornosti je brez dvoma ključen pregleden sistem regulacije področja.

3. REGULATIVA IN VITRO DIAGNOSTIČNIH MEDICINSKIH PRIPOMOČKOV

3.1. Hierarhija pravnih aktov v EU

V regulativi velja hierarhija pravnih aktov od ustave prek systemskega in specialnih zakonov do podzakonskih aktov tipa pravilnik, odredba. V okviru zakonodaje EU se poleg osnovne Pogodbe o delovanju Evropske unije srečamo z dvema ključnima tipoma pravnih aktov: direktive Sveta EU so zakonodajni akti o določenem cilju, ki ga

morajo doseči države EU, pri čemer vsaka država sama sprejme predpise za doseg cilja; uredbe Evropskega parlamenta in Sveta EU pa so pravno zavezujoči akti, ki jih morajo v vseh državah EU uporabljati v celoti (8). To razlikovanje je pomembno, saj imamo na področju *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkov oboje.

3.2. Trenutno stanje v regulativi in implementacija v slovenski pravni red

Trenutno je na področju *in vitro* diagnostike veljavna Direktiva 98/79/ES (9). Slovenija je cilje direktive implementirala v svoj pravni red z Zakonom o medicinskih pripomočkih (10), na osnovi katerega veljajo štirje pravilniki (11, 12, 13, 14). Skladno z veljavno regulativo mora proizvajalec *in vitro* diagnostičnega medicinskega pripomočka pripraviti tehnično dokumentacijo, iz katere je razvidno, da je test varen in učinkovit skladno z zahtevami iz Priloge 1 k Direktivi 98/79/ES. Za izvajalce testiranja so na podlagi Zakona o zdravstveni dejavnosti (15) in standarda EN ISO 15.189 (16) pomembna tudi določila pravilnika o laboratorijski medicini (5). Slednji opredeljuje testiranje v medicinskih laboratorijih in testiranje ob pacientu.

Aprila 2017 sta Evropski parlament in Svet EU sprejela Uredbo (EU) 2017/745 o medicinskih pripomočkih (17) in Uredbo (EU) 2017/746 o *in vitro* medicinskih pripomočkih (18), ki sta začeli veljati s prehodnim obdobjem 3 oziroma 5 let. Tako dolgo prehodno obdobje je predpisano zato, da bi se lahko gospodarski subjekti, zlasti mala in srednja podjetja, priglasi organi, države članice in Evropska komisija prilagodili spremembam, ki jih uvajata Uredbi. Maja 2019 so bili sprejeti popravki obeh Uredb, ki pa ne posegajo v bistvo regulative (19, 20). Obe Uredbi EU začneta avtomatično veljati po preteku prehodnega obdobja, kar pomeni za Uredbo (EU) 2017/746 od 26. 5. 2022, poleg upoštevanja prehodnih določb. Od maja 2017 se skladnost *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkov lahko ugotavlja na osnovi Direktive ali Uredbe, zato se bomo osredotočili predvsem na Uredbo (EU) 2017/746.

Vlada RS je leta 2017 z odredbo o seznamu standardov za domnevo skladnosti (21) določila seznam standardov, katerih uporaba ustvari domnevo o skladnosti medicinskega pripomočka z zahtevami Zakona o medicinskih pripomočkih (10), in nadomestila predhodna seznama iz leta 2004 (22, 23). Za pristojni organ za izvajanje obeh evropskih uredb je določila Javno agencijo Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke (24, 25).

4. UREDBA O IN VITRO DIAGNOSTIČNIH MEDICINSKIH PRIPOMOČKIH

4.1. Izhodišča in cilja uredbe

Uredba (EU) 2017/745 predstavlja *lex specialis* za področje *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkov (18). Izhodišča iz preambule so pomembna, saj se pri

nejasnostih ali sporih ne preverja samo črke, ampak tudi duh zakona, torej kaj je želel zakonodajalec doseči.

Cilja te uredbe sta dva:

- zagotoviti nemoteno delovanje notranjega trga ob upoštevanju malih in srednjih podjetij, dejavnih v tem sektorju, in
- določiti visoke standarde kakovosti in varnosti *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkov, temelječ na visoki ravni varovanja zdravja pacientov in uporabnikov.

Oba cilja sta neločljivo povezana in nobeden od njiju ni drugotnega pomena. Iz preambule je razvidno, da je bil namen zakonodajalca dvig ravni zdravja in varnosti, za kar je bilo treba bistveno okrepiti ključne elemente obstoječega regulativnega pristopa, kot so nadzor priglašениh organov, razvrščanje v razred tveganja, postopki ugotavljanja skladnosti, ocena učinkovitosti in študije učinkovitosti, vigilanca in nadzor trga. Vključiti je bilo treba določbe, ki bi zagotovile preglednost in sledljivost *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkov. Pri tem je bilo treba področje uporabe te uredbe jasno razmejiti od druge zakonodaje o izdelkih, kot so zdravila, kozmetični izdelki, medicinski pripomočki, splošni laboratorijski izdelki in izdelki, namenjeni samo za raziskave (18).

4.2. Opredelitev temeljnih pojmov in področje uporabe

Za pregledno in pravilno uporabo regulative je pomembno, da so uporabljeni pojmi enolično definirani. Tako iz obsežnega seznama Uredbe povzemam nekaj ključnih.

***In vitro* diagnostični medicinski pripomoček**

Pomeni vsak medicinski pripomoček, ki je reagent, reagenčni izdelek, umerjevalec, kontrolni material, komplet, instrument, aparat, del opreme, programska oprema ali sistem, ki se uporablja sam ali v kombinaciji, proizvajalec pa ga je predvidel za uporabo *in vitro* za preiskave vzorcev, vključno z darovano krvjo in darovanimi tkivi, pridobljenimi iz človeškega telesa, samo ali v glavnem za pridobivanje ene ali več naslednjih informacij: (i) o fiziološkem ali patološkem procesu ali stanju; (ii) o prirojenih telesnih ali duševnih prizadetostih; (iii) o nagnjenosti k bolezenskemu stanju ali bolezni; (iv) za določanje varnosti in združljivosti z možnimi prejemniki; (v) za predvidevanje odzivanja ali reakcij na zdravljenje; (vi) za opredelitev ali spremljanje terapevtskih ukrepov. Tudi posode za vzorce štejemo med *in vitro* diagnostične medicinske pripomočke.

Pripomoček za samotestiranje

Pomeni vsak pripomoček, ki ga je proizvajalec namenil za uporabo nestrokovnjakom, vključno s pripomočki, ki se uporabljajo za storitve testiranja, ki se ponujajo v okviru storitev informacijske družbe.

Pripomoček za testiranje ob pacientu

Pomeni vsak pripomoček, ki ni namenjen za samotestiranje, temveč za testiranje zunaj laboratorijskega okolja, ki ga izvaja zdravstveni delavec, običajno blizu pacienta ali ob njem.

Dopolnilna diagnostika

Pomeni pripomoček, ki je bistven za varno in učinkovito uporabo ustreznega zdravila, da se pred in/ali med zdravljenjem ugotovi: (i) za katere paciente je najbolj verjetno, da jim bo ustrezno zdravilo koristilo, ali (ii) pri katerih pacientih verjetno obstaja povečano tveganje resnih neželenih učinkov zaradi zdravljenja z ustreznim zdravilom.

Komplet

Pomeni sestavne dele, ki so skupaj zapakirani in namenjeni za izvedbo specifične *in vitro* diagnostične preiskave ali dela te preiskave.

Posebej je izpostavljeno, da se ta uredba NE uporablja za:

- Izdelke za splošno laboratorijsko uporabo ali izdelke, namenjene izključno za uporabo v raziskavah, razen če je proizvajalec posebej predvidel, da se taki izdelki zaradi svojih lastnosti uporabljajo pri *in vitro* diagnostičnih preiskavah;
- Invazivne izdelke za vzorčenje ali izdelke, ki jih apliciramo neposredno na človeško telo za pridobitev vzorca;
- Mednarodno potrjene referenčne materiale;
- Materiale, ki jih uporabljamo za zunanje sisteme ocenjevanja kakovosti.

Torej je za uvrščanje nekega izdelka pod regulativo te uredbe pomemben **predvideni namen**. Slednji je opredeljen s podatki, ki jih navede proizvajalec na oznaki, v navodilih za uporabo ali v promocijskih ali prodajnih gradivih ali izjavah, ali kot ga opredeli proizvajalec v oceni učinkovitosti. V tem kontekstu pomeni **Navodilo za uporabo** informacije, ki jih zagotovi proizvajalec za obveščanje uporabnika o predvidenem namenu in pravilni uporabi pripomočka ter o morebitnih previdnostnih ukrepih, ki jih sprejmejo. **Ocena učinkovitosti** pa pomeni oceno in analizo podatkov za ugotavljanje ali preverjanje znanstvene veljavnosti, analize in klinične

učinkovitosti pripomočka, ki je vezana na klinično korist kot pozitiven učinek pripomočka v zvezi z njegovim delovanjem. Kot delovanje je navedeno primeroma presejanje, spremljanje, diagnosticiranje ali pomoč pri diagnosticiranju pacientov ali pozitiven učinek na obravnavo pacientov ali javno zdravje. Tu so jasno zajeti tako principi hitrega testiranja, testiranja ob pacientu kot tudi samotestiranja. Pri tem se upošteva, da se koncept **klinične koristi** *in vitro* medicinskih pripomočkov bistveno razlikuje od koncepta koristi farmacevtskih ali terapevtskih medicinskih pripomočkov. Korist *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkov je v zagotavljanju natančne zdravstvene informacije o pacientu, ki jo po potrebi primerjamo z zdravstvenimi informacijami, pridobljenimi z uporabo drugih diagnostičnih možnosti in tehnologij. Končni klinični izid za pacienta pa je odvisen od nadaljnjih diagnostičnih in/ali terapevtskih možnosti, ki so morda razpoložljive. Klinični dokazi bi morali biti pridobljeni iz študij učinkovitosti, za izvedbo katerih je odgovoren sponzor. Vlogo sponzorja prevzame proizvajalec ali druga fizična ali pravna oseba, ki prevzame odgovornost za študijo učinkovitosti.

4.3. Razvrščanje *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkov glede na predvideni namen

Pri razvrščanju v razrede A, B, C in D so ključni predvideni namen in z njim povezana tveganja. Vedno se uporabi pravilo, ki vodi do razvrstitve v višji razred. Navajam nekoliko poenostavljena pravila s skrajšanim besedilom iz Priloge Uredbe (18). Za razvrščanje je treba slediti izvornemu besedilu Uredbe (18).

Pravilo 1

V razred D se razvrstijo pripomočki, ki so predvideni za uporabo za naslednje namene:

- Za odkrivanje prisotnosti prenosljivega povzročitelja v celicah, tkivih in organih, da ocenimo njihovo ustreznost za transfuzijo, presaditev ali dajanje celic; sem sodijo tudi pripomočki za odkrivanje izpostavljenosti prenosljivemu povzročitelju z navedenim namenom.
- Za odkrivanje prisotnosti prenosljivega povzročitelja ali izpostavljenosti prenosljivemu povzročitelju, ki povzroča življenjsko nevarno bolezen z visoko stopnjo tveganja širjenja bolezni.
- Za določanje kužnega obsega življenjsko nevarne bolezni, kadar je njeno spremljanje bistveno v procesu obravnavanja pacienta.

Pravilo 2

Pripomočki, ki so predvideni za določanje krvnih skupin ali tipizacijo tkiv, da zagotovimo imunološko ustreznost za transfuzijo ali presaditev ali dajanje celic, se

razvrstijo v razred C, razen če so predvideni za določanje sistemov AB0, Rhesus, Kell, Kidd in Duffy. V tem primeru se razvrstijo v razred D.

Pravilo 3

Pod to pravilo sodi kar 13 posamičnih namenov, ki uvrščajo pripomočke v razred C, primeroma:

- Za (i) odkrivanje prisotnosti spolno prenosljivih povzročiteljev ali (ii) izpostavljenosti spolno prenosljivim povzročiteljem;
- Za odkrivanje prisotnosti povzročitelja okužbe, če obstaja znatno tveganje, da bi napačen rezultat povzročil smrt ali hudo invalidnost testiranega posameznika, ploda ali zarodka ali posameznikovih potomcev;
- Za (i) določanje statusa bolezni ali (ii) določanje imunskega statusa ali (iii) spremljanje ravni zdravil, učinkovin ali bioloških sestavin, če obstaja tveganje, da bi napačen rezultat privedel do odločitve za obravnavanje pacienta, katere posledica bi bil življenjsko nevaren položaj za pacienta ali pacientove potomce;
- Dopolnilno diagnostiko;
- Presejanje, diagnosticiranje ali oceno stadija raka;
- Izvajanje človeškega genetskega testiranja;
- Presejanje za prirojene motnje zarodka ali ploda ali novorojenčkov.

Pravilo 4

Obravnava pripomočke za (i) testiranje ob pacientu, ki se razvrščajo individualno, in za (ii) samotestiranje, ki se razvrstijo v razred C. Izjema so pripomočki za samotestiranje za ugotavljanje nosečnosti, za preskus plodnosti in za določanje ravni holesterola ter pripomočki za odkrivanje glukoze, eritrocitov, levkocitov in bakterij v urinu, ki se razvrstijo v razred B.

Pravilo 5

Izdelki za splošno laboratorijsko uporabo, puferske raztopine in mediji, posode za vzorce in instrumenti, za katere je proizvajalec posebej predvidel uporabo pri *in vitro* diagnostičnih postopkih, se razvrstijo v razred A.

Pravilo 6

Predpisuje, da se pripomočki, ki niso zajeti v predhodno navedena pravila za razvrščanje, razvrstijo v razred B.

Pravilo 7

V razred B se razvrstijo tudi kontrole brez kvantitativne ali kvalitativne pripisane vrednosti.

5. NADZOR TRGA IN OBVEZE POSAMEZNIH SUBJEKTOV

5.1. Splošne obveze vseh v procesu dajanja pripomočka na trg in v uporabo

Nadzor trga po Uredbi pomeni dejavnosti in ukrepe javnih organov, ki so namenjeni preverjanju in zagotavljanju, da pripomočki izpolnjujejo predpisane zahteve in da ne ogrožajo zdravja, varnosti ali katerega koli drugega vidika varovanja javnih interesov. Iz tega izhajajo obveze posameznih subjektov v verigi preskrbe z njimi. Proizvajalci, pooblaščen predstavniki, uvozniki, distributerji, torej vsi v procesu dajanja pripomočka na trg in v uporabo, sodelujejo s pristojnimi organi in na njihovo zahtevo posredujejo vse razpoložljive informacije in dokumentacijo, ki so potrebne, da dokažejo skladnost pripomočka ali da odpravijo oziroma omilijo tveganja, povezana s pripomočki na trgu (sistem spremljanja vigilance).

5.2. Specifične obveze držav članic

Države članice so dolžne Uredbo izvajati v celoti. Pri tem pregledujejo in ocenjujejo delovanje svojih dejavnosti nadzora trga vsaj vsaka štiri leta, rezultate pregledov in ocen pa sporočajo ostalim državam članicam in Komisiji. Kadar država članica po oceni, ki je pokazala na morebitno tveganje, meni, da bi bilo treba zaradi varovanja zdravja in varnosti pacientov, uporabnikov ali drugih oseb ali drugih vidikov javnega zdravja dostopnost na trgu ali dajanje v uporabo pripomočka odpoklicati, prepovedati, omejiti ali odobriti pod posebnimi zahtevami, lahko sprejme vse potrebne in upravičene ukrepe. V primeru uporabe genskega testa v okviru zdravstvenega varstva mora država članica zagotoviti ustrezno možnost svetovanja.

5.3. Splošne obveze proizvajalcev

Proizvajalci pri dajanju pripomočkov na trg ali v uporabo zagotovijo, da so bili ti zasnovani in izdelani v skladu z zahtevami uredbe. Za to vzpostavijo, izvajajo, dokumentirajo, vzdržujejo, posodablajo in izboljšujejo sistem vodenja kakovosti. Za vsak pripomoček izvedejo postopek ocene učinkovitosti. Informacije, ki jih priložijo pripomočkom za samotestiranje ali testiranje ob pacientu, so razumljive in navedene v uradnem jeziku države, v kateri je pripomoček dostopen. Proizvajalci imajo v svoji organizaciji vsaj eno osebo, ki je odgovorna za skladnost z zakonodajo in ima potrebno strokovno znanje na področju *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkov. Mikro in malim podjetjem ni treba imeti take osebe znotraj podjetja, jim pa mora biti stalno

in nepretrgoma na voljo. Če proizvajalec pripomočka nima sedeža v državi članici, mora imenovati pooblaščenega predstavnika, ki preverja izjave o skladnosti, tehnično dokumentacijo in zagotovi registracijo.

5.4. Splošne obveze uvoznikov in distributerjev

Uvozniki dajejo na trg Unije le pripomočke, ki so skladni z Uredbo. Pred tem preverijo, da je proizvajalec znan, da je imenoval pooblaščenega predstavnika ter da je pripomoček ustrezno označen in opremljen z navodili. Dejavnosti distributerjev zajemajo pridobivanje, hrambo in dobavo pripomočkov. Distributerji pred omogočanjem dostopnosti pripomočka na trgu preverijo, ali uvoznik izpolnjuje predpisane zahteve in ali je pripomoček opremljen z izjavo o skladnosti, oznako CE in zahtevanimi informacijami proizvajalca. Uvozniki in distributerji zagotovijo, da so v času, ko so odgovorni za pripomoček, pogoji skladiščenja ali prevoza skladni s pogoji, ki jih je določil proizvajalec, in ne ogrožajo njegove skladnosti s splošnimi zahtevami glede varnosti in učinkovitosti.

5.5. Obveze zdravstvenih ustanov

Uredba se, z izjemo splošnih zahtev o varnosti in učinkovitosti, ne uporablja za pripomočke, ki jih proizvajajo in uporabljajo le v zdravstvenih ustanovah. Morajo pa te ustanove izpolnjevati določene pogoje: laboratorij ustanove mora na primer izpolnjevati zahteve iz standarda EN ISO 15.189 ali ustrezne nacionalne regulative.

6. DODATNE POSEBNOSTI SAMOTESTIRANJA IN TESTIRANJA OB PACIENTU

6.1. Povzetek o varnosti in učinkovitosti

Z vidika samotestiranja, testiranja ob pacientu ali testiranja v laboratoriju je pomembna opredelitev proizvajalca v povzetku o varnosti in učinkovitosti, ki vsebuje predvideni namen pripomočka ter predlagani profil uporabnikov in njihovo usposabljanje. Povzetek o varnosti in učinkovitosti je sestavljen tako, da je razumljiv predvidenemu uporabniku in po potrebi pacientu, ter je na voljo javnosti (18).

6.2. Dodatne posebnosti za testiranje ob pacientu

Testiranje, ki se izvaja ob ali v bližini pacienta (6), uvajamo z namenom, da je rezultat analize biološkega vzorca za terapevtsko odločitev na razpolago takoj, ker bi v času, ki ga potrebuje laboratorij za rezultat, lahko bilo ogroženo pacientovo zdravje. To je zlasti pomembno v enotah za nujno medicinsko pomoč, oddelkih z intenzivno terapijo, operacijskih sobah ali intervencijskih enotah. Glede organizacije in izvajanja

je v Sloveniji merodajen pravilnik o laboratorijski medicini (5). Za aktualno epidemiološko situacijo covid-19 pa je smiselno upoštevati smernice WHO (26).

6.3. Dodatne posebnosti za samotestiranje

Za samotestiranje iz radovednosti lahko posameznik načeloma uporabi, kar je na voljo, saj sam nosi odgovornost. Vendar pa velja glede na smernice komisije EU omejitev za dobavitelje končnemu uporabniku (27): pripomočkov, namenjenih za poklicno uporabo, zakonsko ni dovoljeno dati na voljo nestrokovnim uporabnikom.

7. ZAKLJUČEK

Regulativa medicinskih pripomočkov, namenjenih testiranju ob pacientu in samotestiranju, je del celovitega obravnavanja *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkov. Pri tem je ključen predvideni namen pripomočka, kot ga navede in registrira proizvajalec skladno z Uredbo o *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkih, ki je s prehodnim obdobjem stopila v veljavo leta 2017 (18). Za samo izvajanje testiranja ob pacientu sta pomembna tudi nacionalni Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine (5), in standard ISO 15.189 (16), za samotestiranje pa mednarodne (6) in nacionalne smernice (7). Regulativa EU je usmerjena v zagotavljanje visokega varstva preiskovancev in nemoteno delovanje notranjega trga ob upoštevanju malih in srednjih podjetij, dejavnih v tem sektorju.

LITERATURA

1. Bureau International des Poids et mesures. International Vocabulary of Metrology- Basic and General Concepts and Associated Terms. <https://www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html>. Datum dostopa: 3.5.2021
2. Thomas L. Laboratory organization. V: Thomas L (urednik) Clinical Laboratory Diagnostics 2020, 10.electronic English edition. <https://www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/> . Datum dostopa 3.5.2021.
3. Evropska komisija. Ocena zdravstvenih tehnologij. Datum dostopa 3.5.2021 https://ec.europa.eu/health/technology_assessment/overview_sl.
4. Božič B, Obreza A, Marc J, Lukač-Bajalo J. Merjenje imunosti – od molekule do bolnika. UL FFA Ljubljana 2017.
5. Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine. Uradni list RS 64/04, 17/16 in 56/19.
6. Standard ISO 22870:2016. Point-of-care testing (POCT) – Requirements for quality and competence. <https://www.iso.org/standard/71119.html>. Datum dostopa: 3.5.2021.
7. Prezelj M, Bratož S. Priporočila za organiziranje in izvajanje laboratorijskih testov ob pacientu. Priporočeni postopki št 11, SZKKLM, Ljubljana 2014.

8. Evropska unija. Uredbe, direktive in drugi akti. https://europa.eu/european-union/law/legal-acts_sl. Datum dostopa: 3.5.2021.
9. Direktiva 98/79/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 27. oktobra 1998 o *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkih. Konsolidirano besedilo, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A01998L0079-20120111&qid=1409138935318>. Datum dostopa: 3.5.2021.
10. Zakon o medicinskih pripomočkih. Uradni list RS, št. 98/09.
11. Pravilnik o medicinskih pripomočkih. Uradni list RS, št. 37/10 in 66/12.
12. Pravilnik o proizvodnji in prometu z medicinskimi pripomočki. Uradni list RS, št. 37/10.
13. Pravilnik o vigilanci medicinskih pripomočkov. Uradni list RS, št. 61/10.
14. Pravilnik o pristojbinah na področju medicinskih pripomočkov Uradni list RS, št. 24/19).
15. Zakon o zdravstveni dejavnosti. Neuradno prečiščeno besedilo št. 26. <http://pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=ZAKO214#>. Datum dostopa: 3.5.2021.
16. Standard EN ISO 15189 Medical laboratories – Requirements for quality and competence. <https://www.iso.org/standard/56115.html>. Datum dostopa: 3.5.2021.
17. Uredba (EU) 2017/745 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 5. aprila 2017 o medicinskih pripomočkih, spremembi Direktive 2001/83/ES, Uredbe (ES) št. 178/2002 in Uredbe (ES) št. 1223/2009 ter razveljavitvi direktiv Sveta 90/385/EGS in Direktive Sveta 93/42/EGS. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=CELEX%3A32017R0745>. Datum dostopa: 3.5.2021.
18. Uredba (EU) 2017/746 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 5. aprila 2017 o *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkih ter razveljavitvi Direktive 98/79/ES in Sklepa Komisije 2010/227/EU. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=CELEX%3A32017R0746>. Datum dostopa: 3.5.2021.
19. Popravki Uredbe (EU) 2017/745; https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2019.117.01.0009.01.SLV&toc=OJ:L:2019:117:TOC. Datum dostopa: 3.5.2021.
20. Popravki Uredbe (EU) 2017/746. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2019.117.01.0011.01.SLV&toc=OJ:L:2019:117:TOC. Datum dostopa 3.5.2021.
21. Odredba o seznamu standardov, katerih uporaba ustvari domnevo o skladnosti medicinskega pripomočka z zahtevami Zakona o medicinskih pripomočkih. Uradni list RS, št. 28/11 in 15/17.
22. Seznam standardov, katerih uporaba ustvarja domnevo o skladnosti *in vitro* diagnostičnega medicinskega pripomočka s pravilnikom o *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkih. Uradni list RS, št. 16/04.
23. Seznam standardov, katerih uporaba ustvarja domnevo o skladnosti medicinskega pripomočka s pravilnikom o medicinskih pripomočkih. Uradni list RS, št. 16/04.
24. Uredba o izvajanju uredbe (EU) o medicinskih pripomočkih. Uradni list RS, št. 16/18.
25. Uredba o izvajanju uredbe (EU) o *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkih. Uradni list RS, št. 16/18.
26. WHO 2020. Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19. <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/advice-on-the-use-of-point-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19>. Datum dostopa 3.5.2021.
27. Sporočilo EU komisije. Smernice glede *in vitro* diagnostičnih testov na COVID-19 in njihove učinkovitosti. Uradni list EU 2020/C 122 I/01. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=OJ:C:2020:122I:TOC>. Datum dostopa 3.5.2021.

TESTI OB PREISKOVANCU – STORITEV V ZUNANJIH LEKARNAH

doc. dr. Nejc Horvat, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za socialno farmacijo

POVZETEK

Testi ob preiskovancu so laboratorijski testi, ki se izvajajo ob ali v bližini pacienta, rezultati pa lahko vplivajo na takojšnjo spremembo oskrbe. Predstavljajo eno izmed smeri razvoja lekarniških storitev, saj lekarne ponujajo izjemno dostopnost teh storitev ter izučeno osebje, ki ima lahko pomembno vlogo pri odkrivanju in nadzoru bolezni. Ker testi dajejo takojšnje rezultate, lahko z izvajanjem teh storitev v zunanjih lekarnah sprejemamo informirane odločitve o terapiji, ki pacientom prihranijo večkratne obiske zdravstvenih ustanov, razbremenijo pa tudi ostale zdravstvene delavce in s tem prinašajo finančne prihranke. Kakovost izvedbe in posledična zanesljivost rezultatov testov, izvedenih v zunanjih lekarnah, je zadovoljiva glede na laboratorijske standarde. V evropskem prostoru izvajajo predvsem teste, ki merijo koncentracijo holesterola in glukoze pa tudi storitve merjenja krvnega tlaka in telesne mase. Raziskave vpliva izvedbe testov na klinične izide sicer ne kažejo značilnih razlik v smislu koristi izvajanja teh testov v zunanjih lekarnah, vendar so izvedene raziskave trenutno še nizke kakovosti. Glavni izzivi pri uspešni implementaciji testov ob preiskovancu v zunanje lekarne so sprememba dojemanja farmacevtov kot kliničnih zdravstvenih delavcev, razvoj izobraževanja na tem področju, integracija v delovne procese in infrastrukturo, vzpostavitev shem poplačila stroškov, postavitve načina upravljanja s pridobljenimi podatki, vzpostavitev sistema nadzora in vodenja kontrole kakovosti, povečanje zavedanja pacientov o storitvah ter vzpostavitev protokolov sodelovanja z zdravniki.

1. UVOD

Leto 2035. Prof. dr. Mojca Kerec Kos predava pri predmetu Klinična farmacija, ki je obvezen za vse študente farmacije. Ravno kar razlaga o razvoju klinične farmacije. Eden izmed študentov nenadoma začuden dvigne roko: »A pred 20 leti so farmacevti v lekarni kar izdali zdravilo? Niso imeli možnosti predhodnega vpogleda v rezultate farmakogenetskih testov in biokemijskih analiz, da bi lažje in natančneje odločali o pravilnosti ali morebitnem popravku izbranega odmerka? Kako pa so vedeli, ali je neka terapija učinkovita? Ali pa sploh smiselna?« Prof. Kerec Kos skomigne z rameni: »To je bil še čas, ko nismo poznali prednosti farmakogenetike in preden so testi ob preiskovancu postali standarden del lekarniške prakse.«

Staranje populacije, ki smo mu priča v obsežnem delu Evrope, vodi v višjo pojavnost kroničnih bolezni, kar povečuje zahteve in pritisk na zdravstvene storitve. Če k temu dodamo še relativno pomanjkanje zdravnikov družinske medicine, ki je v Sloveniji že bolj izraženo kot drugod, potem postane potreba po bolj integriranem pristopu k zdravstveni oskrbi še toliko jasnejša. Tako se je dramatično spremenil način zagotavljanja zdravstvene oskrbe pacientom. Iz centraliziranih, rigidnih modelov, ki so ustvarjali časovne in lokacijske ovire za paciente, smo prešli na modele, pri katerih lahko pacienti dostopajo do zdravstvene oskrbe, ko jo potrebujejo in kjer si jo želijo (1–3).

Del te integrirane oskrbe je tudi želja po hitrem in priročnem zagotavljanju rezultatov diagnostičnih testov v primarni zdravstveni oskrbi. Farmacevti, ki delujejo v zunanjih lekarnah, so kot najdostopnejši zdravstveni strokovnjaki v idealni poziciji, da podprejo te procese. Lekarniški farmacevti so v preteklosti začeli širiti svojo vlogo z zgolj izdaje zdravil na druge aktivnosti, ki podpirajo zdravje pacientov, npr. pregled uporabe zdravil, farmakoterapijski pregled, v drugih evropskih državah pa tudi presejanje na različne kronične bolezni, cepljenja, promocije zdravja ipd. Napredek tehnologije na področju testov ob preiskovancu (*ang. point-of-care test, POCT*), ki omogoča prenosne POCT, enostavne za uporabo, lahko pomeni tudi utrditev vloge farmacevta kot kompetentnega zdravstvenega delavca na tem področju (3, 4).

Poznamo številne definicije testov ob preiskovancu. Vsem je skupno to, da gre za laboratorijske teste, ki se izvajajo ob ali v bližini pacienta, rezultati pa lahko vplivajo na takojšnjo spremembo njegove oskrbe (4–7). Teste ob preiskovancu so sicer poznali že v zgodnjih dneh zahodne medicine (19. stoletje), ko je bila zdravstvena oskrba zagotovljena predvsem na domovih pacientov (npr. obiski zdravnikov). Tudi omejeno testiranje, ki so ga takrat poznali, so izvedli tam. Z napredkom medicinske znanosti in tehnologije je bila oskrba pacientov preusmerjena na bolnišnice s poudarkom na zdravljenju poškodb in akutnih bolezni. V tem času so bili ustanovljeni tudi centralizirani laboratoriji, kjer so analizirali številne vzorce pacientov. Danes se zaradi odkrivanja novih označevalcev bolezni in inovativnih tehnologij zdravstvena oskrba

vrača v bližino pacienta. Testi ob preiskovancu zaradi večje dostopnosti omogočajo premik fokusa na zgodnje odkrivanje in preventivo, prav tako pa učinkovitejšo obravnavo določenih kroničnih bolezni (4).

2. PREDNOSTI IZVEDBE TESTOV OB PREISKOVANCU V ZUNANJIH LEKARNAH

Testi ob preiskovancu, izvedeni v zunanjih lekarnah, ponujajo številne prednosti.

Izjemen dostop.

Široka mreža lokacij lekarn zagotavlja enostaven dostop do testov. Lekarne imajo dolg odpiralni čas in so pogosto odprte tudi ob koncu tedna. Za obisk se ni treba naročiti in jih zato pacienti pogosto obiskujejo. 98 % prebivalcev EU lahko do najbližje lekarne dostopa v 30 minutah (5, 8, 9).

Izučeno in zaupanja vredno osebje.

Farmacevti so najdostopnejši zdravstveni kader in eden najbolj zaupanja vrednih virov zdravstvenih informacij za paciente. S pacienti so redno v stikih in zaradi dobrih komunikacijskih veščin lahko vzpostavijo osebne odnose z njimi (3, 6).

Takojšnji rezultati.

Z izvedbo testa v lekarniškem okolju se skrajša čas, potreben za transport, procesiranje vzorca v laboratoriju in povratno komunikacijo rezultatov. Običajno dajo testi rezultate v nekaj minutah, kar omogoča takojšnje klinične odločitve še ob istem obisku. Leta 2019 so na Severnem Irskem poskusno uvedli storitev, pri kateri so v zunanjih lekarnah izvajali teste CRP in na okužbo s streptokokom A. Rezultati so informirali takojšnjo odločitev o (ne)uporabi antibiotikov, kar je zmanjšalo uporabo antibiotikov za okoli 45 % (10). Posledično se je zmanjšalo tudi število potrebnih obiskov zdravstvenih ustanov (11, 12).

Razbremenitev ostalih deležnikov zdravstvenega sistema.

S prevzemanjem vloge izvajalca testov ob preiskovancu farmacevti razbremenijo zdravnike, prav tako pa lahko z boljšim nadzorom kroničnih bolezni zmanjšajo število hospitalizacij in ponovnih hospitalizacij pacientov (6, 13).

Odkrivanje in nadzor kroničnih bolezni.

Testi ob preiskovancu so zelo uporabni za odkrivanje in nadzor nad kroničnimi nenalezljivimi boleznimi, kot so sladkorna bolezen, hipertenzija, srčno popuščanje, kronična ledvična odpoved ipd. Testi omogočajo farmacevtom, da preverijo tveganja, nadzorujejo zdravstvene izide, referirajo k zdravniku, izboljšujejo adherenco in zmanjšujejo nepotrebna ali neprimerna zdravila. Čeprav so testi enostavni za izvedbo, jih morebitna analitična nenatančnost usmerja predvsem v presejalne in ne toliko v diagnostične namene (3, 6, 12).

Finančni prihranki.

Posledica zgoraj navedenih prednosti so tudi ekonomske koristi implementacije testov ob preiskovancu v lekarnah. Stroški zdravljenja se znižajo zaradi racionalnejšega predpisovanja, boljšega nadzora nad izidi, manj neželenih učinkov, manj hospitalizacij ter manjših stroškov dela. Vendar je morebitne prihranke treba uravnotežiti glede na stroške izvedbe testov ob preiskovancu izven medicinskega laboratorija (3, 14).

3. PRIMERI TESTOV OB PREISKOVANCU

Testi ob preiskovancu so lahko koristni le, če so ustrezno izvedeni in dajejo visokokakovostne rezultate. Svetovna zdravstvena organizacija je z akronimom ASSURED definirala 6 lastnosti, ki naj bi jih izkazoval vsak test ob preiskovancu (12, 15). V Preglednici 1 so razložene posamezne lastnosti.

Preglednica 1: Potrebne lastnosti testov ob preiskovancu po Svetovni zdravstveni organizaciji.

Akronim	Lastnost	Razlaga
A	Affordable	Testi so cenovno dostopni pacientom ali zdravstvenim zavarovalnicam.
S	Sensitive	Klinična občutljivost testov (čim manj lažno negativnih rezultatov).
S	Specific	Klinična specifičnost testov (čim manj lažno pozitivnih rezultatov).
U	User-friendly	Enostavna, neinvazivna izvedba.
R	Rapid & Robust	Testi dajejo hitre in ponovljive rezultate.
E	Equipment-free	Za izvedbo testa ni potrebna draga in kompleksna oprema.
D	Deliverable	Testi so dostopni pacientom oz. jih je možno dostaviti na težje dostopne lokacije (npr. Afrika).

V evropskih lekarnah in lekarnah v ZDA so tako že na voljo testi za določanje koncentracije glukoze v krvi, glikiranega hemoglobina, TSH, holesterola, INR, ketonov v krvi, albuminov v urinu. S testi ob preiskovancu v lekarnah testirajo tudi prisotnost nalezljivih bolezni, kot so gripa, streptokok A, HIV, adenovirus in hepatitis C (3, 6, 12, 13). Farmakogenomska testiranja še niso splošno uveljavljena, jih pa intenzivno razvijajo. Pojavljajo se testi, ki z bukalnim brisom omogočajo merjenje sposobnosti metabolizma učinkovin. Farmacevti kot strokovnjaki za zdravila morajo biti v ospredju pri razvoju in implementaciji tega področja (4).

4. RAZŠIRJENOST TESTOV OB PREISKOVANCU V EVROPI

Napredne klinične storitve, ki ponujajo teste ob preiskovancu za presejanje in diagnozo bolezni, še niso široko dostopne v vseh evropskih državah. Farmaceutska skupina Evropske unije (The Pharmaceutical Group of the European Union, PGEU) je v letu 2017 med svojimi člani izvedla anketo o razširjenosti in naboru storitev, ki jih zagotavljajo v svojih lekarnah. Poglavitne storitve so oskrba z zdravili, promocija racionalne uporabe zdravil, obvladovanje kroničnih bolezni ter storitve testiranja in merjenja. Pri slednjih je anketa pokazala, da kar 90 % lekarn zagotavlja storitev merjenja krvnega tlaka in telesne mase, 77 % lekarn merjenje glukoze v krvi in 73 % merjenje holesterola (9). V okviru mednarodnega projekta PRACTISE je bila leta 2017 izvedena anketa o implementaciji kognitivnih storitev v Evropi, ki jih zagotavljajo farmacevti na primarnem nivoju. Odzvali so se udeleženci iz 34 od 44 evropskih držav. Med drugim so bili povprašani tudi o implementaciji testov ob preiskovancu v zunanjih lekarnah. Udeleženci iz 23 od 34 držav (67,7 %) so odgovorili, da so take storitve na voljo v njihovi državi. Od teh 23 jih je 7 (30,4 %) odgovorilo, da je to neodvisna storitev, v 16 državah pa je to del storitve izdaje zdravil. Predvsem so izpostavili merjenje holesterola, glukoze in krvnega pritiska. V primerjavi s podobno anketo iz leta 2015 se je delež držav, ki zagotavljajo teste ob preiskovancu, povečal (16).

V zadnjem desetletju je bilo v Evropi izvedenih kar nekaj raziskav, s katerimi so preverjali izvedljivost storitve (*ang. feasibility study*) testov ob preiskovancu v zunanjih lekarnah.

4.1. Nizozemska, 2011, kreatinin

V treh zunanjih lekarnah so farmacevti v sodelovanju z zdravniki preverjali raven kreatinina v kapilarni krvi. V raziskavo so povabili vse starejše od 70 let, ki so prejeli zdravila, ki se izločajo preko ledvic, za zdravljenje sladkorne bolezni ali kardiovaskularnih bolezni. Farmacevti so bili pred raziskavo deležni izobraževanja, kjer so se usposobili za tako delo. Na osnovi rezultatov ravni kreatinina so ocenili ledvično funkcijo pacientov. Slednjo so upoštevali pri pregledu pacientovih zdravil, ki

so ga opravili po tem. Pri 24 od 44 pacientov so morali ustrezno prilagoditi terapijo (odmerke, pogostost odmerjanja, potrebo po nadzoru, ukinitvev ali zamenjavo zdravila). Pacienti za storitev niso plačali ničesar, cena enega testa pa je bila okoli 8 €, kar ne vključuje stroškov nakupa opreme in izobraževanja farmacevtov. Analiza je pokazala, da bi z izvajanjem te storitve v lekarni prihranili 86 €/pacienta/leto, v glavnem zaradi zmanjšane števila hospitalizacij. Odgovori na anketni vprašalnik, ki so ga po koncu izpolnili pacienti, farmacevti in zdravniki, so kazali na odobravanje storitve in možno implementacijo (3, 17).

4.2. Severna Irska, 2019, CRP in streptokok A

Farmacevti so na podlagi literature in posvetov z zdravniki razvili storitev, pri kateri so v lekarni uporabili dva testa, in sicer za C-reaktivni protein (CRP) in streptokok A (strep A), z namenom racionalnejše uporabe antibiotikov. Storitve je potekala v 5 lekarnah s podporo lokalnih zdravnikov. Farmacevti so bili deležni izobraževanja za izvedbo merjenja. Vključeni so bili pacienti s simptomi kašlja, prehlada ali gripe. Pacientom s produktivnim kašljem so pomerili CRP v kapilarni krvi. Tisti, ki so imeli visoko koncentracijo CRP (nad 80 mg/L), so bili napoteni k zdravniku za nadaljnjo obravnavo. Pacientom, ki so imeli vneto grlo, pa so ponudili strep A test. Na podlagi pozitivnega rezultata je farmacevt izdal antibiotik. Od 446 vključenih pacientov jih je bilo le 14 pozitivnih na strep A in so prejeli antibiotike. Od 278 pacientov z vnetim grlom sta le 2 imela CRP nad 80 mg/L. Tema je zdravnik predpisal antibiotike. Med pacienti, ki jih niso napotili k zdravniku (305), jih je 50 kljub temu odšlo k zdravniku. 49 od tega jih je dobilo antibiotike, kar kaže na močno usidrano navado predpisovanja antibiotikov. Glede na enako obdobje v prejšnjem letu se je predpisovanje antibiotikov v povprečju znižalo za kar 45 %. Vsi udeleženci so izkazovali zadovoljstvo s storitvijo in željo, da se jo implementira na nacionalni ravni. Prihranke storitve, v katero je bilo vključenih 425 pacientov, so ocenili na približno £ 3800, pri čemer so upoštevali tudi stroške opreme, materiala in izobraževanja (10).

4.3. Norveška, 2016, HbA1c

V raziskavi so sodelovale tri lekarne iz različnih okolij. V vsaki so izobrazili dva farmacevta v oceni tveganja za sladkorno bolezen, vključno z odvzemom kapilarne krvi. Paciente so v študijo povabili prek lokalnih časopisov, družabnih omrežij, letakov in posterjev. Storitve je bila za paciente brezplačna. Najprej so udeleženci izpolnili vprašalnik, s pomočjo katerega so farmacevti ocenili tveganje za sladkorno bolezen. Tistim, ki so imeli povečano tveganje, so ponudili še merjenje glikiranega hemoglobina. Udeleženci, ki so imeli več kot 6,5 % HbA1c, so bili napoteni k zdravniku. Od 211 udeležencev jih je po vprašalnikih 47 izkazovalo visoko tveganje

za sladkorno bolezen. Tem 47 so farmacevti izmerili HbA1c, trije so imeli vrednosti nad 6,5 %. Avtorji so na podlagi rezultatov in mnenj udeležencev zaključili, da je storitev izvedljiva v zunanjih lekarnah na Norveškem (18).

Izvedene študije kažejo na pozitivne izide kliničnih storitev farmacevtov v zunanjih lekarnah v Evropi.

5. NATANČNOST IN TOČNOST TESTOV OB PREISKOVANCU, IZVEDENIH V ZUNANJIH LEKARNAH

Eden največjih izzivov pri uporabi testov ob preiskovancu v zunanjih lekarnah sta natančnost in točnost teh testov. Sistemi za teste ob preiskovancu lahko uporabljajo drugačne tehnologije od tistih, ki se uporabljajo v medicinskih laboratorijih, posledično lahko prihaja tudi do različnih rezultatov. Dodatni dejavniki, ki lahko vplivajo na neskladnost rezultatov, so razlike v kakovosti vzorca, predanalitski dejavniki, usposobljenost osebja za izvedbo in drugi tehnični dejavniki (4).

Kot pri vsakem drugem instrumentu tudi pri testih ob preiskovancu velja, da je test toliko zanesljiv in rezultat toliko pravilen, kot je kompetenten operator testa. Zato je stalna zavezanost k zagotavljanju kakovosti bistven sestavni del testov ob preiskovancu. Zagotavljanje, da te teste izvaja samo dovolj usposobljeno osebje, je dober korak k zmanjšanju števila človeških napak. Zanesljive rezultate testov ob preiskovancu dobimo z doslednim izvajanjem notranje (*Internal Quality Control, IQC*) in zunanje (*External quality assessment, EQA*) kontrole kakovosti. Notranja kontrola kakovosti preverja sposobnost testa, da dobimo ponovljive in natančne rezultate. Običajno v ta namen izvajamo analize kontrolnih vzorcev z znanimi koncentracijami, točnost testov pa preverjamo z zunanjo kontrolo kakovosti, kjer testiramo vzorce iz zunanega vira z neznanimi koncentracijami. Rezultate testa nato primerjamo z deklariranimi vrednostmi. V vsakem primeru je treba dokazati enakovrednost kakovosti rezultatov testov ob preiskovancu in običajnih testov v medicinskem laboratoriju (11).

Na Norveškem so v okviru zgoraj opisane študije (merjenje HbA1c v zunanjih lekarnah) izvajali tudi notranjo in zunanjo kontrolo kakovosti ter jo primerjali z meritvami pri zdravnikih. Ugotovili so, da so farmacevti sposobni izvajati obe vrsti kontrole kakovosti. Pokazali so dobre rezultate tako pri interni (samo 2 od 89 meritev izven območja sprejemljivosti) kot pri eksterni kontroli kakovosti (nobene meritve s slabo oceno za točnost in natančnost) (19). Sistematični pregled analitične kakovosti testov ob preiskovancu, ki so jih izvedli v zunanjih lekarnah, je pokazal zadovoljivo analitično kakovost v primerjavi z laboratorijskimi standardi (12).

6. VPLIV IZVEDBE TESTOV OB PREISKOVANCU V ZUNANJIH LEKARNAH NA KLINIČNE IZIDE

Večina raziskav, s katerimi so iskali dokaze za vpeljavo testov ob preiskovancu v zunanje lekarne, se je osredotočala na primerjavo rezultatov z laboratorijskimi vrednostmi in dokazi enakovredne kakovosti, le peščica raziskav pa je preučevala klinične izide takih storitev. Albasri in sod. so izvedli sistematični pregled in metaanalizo učinkovitosti izvedbe testov ob preiskovancu v zunanji lekarni v primerjavi s kontrolo/običajno oskrbo. Našli so 13 raziskav, od katerih so bile le 4 kontrolirane klinične študije. Večina jih je bila izvedena v ZDA. Rezultati so pokazali, da so testi ob preiskovancu v lekarnah zmanjšali uporabo antimalarikov v primerjavi z običajno oskrbo. Izvajanje meritev INR v lekarnah ni pokazalo prednosti v smislu nadzora INR (% časa v tarčnem območju INR). Nakazoval se je sicer trend v prid lekarnam, vendar so bili rezultati neznačilni. Klinične študije niso pokazale značilne razlike v koncentraciji celokupnega holesterola glede na običajno oskrbo, pri opazovalnih študijah pa se je pokazal značilen upad celokupnega holesterola pri skupini, ki je bila deležna testov ob preiskovancu v zunanjih lekarnah. Metaanaliza je prav tako pokazala značilen upad koncentracije LDL in neznačilen porast koncentracije HDL glede na običajno oskrbo. V dveh opazovalnih raziskavah so preučevali učinek testov ob preiskovancu v lekarnah na nadzor glikiranega hemoglobina, vendar niso mogli potrditi značilnega znižanja HbA1c. Avtorji sistematičnega pregleda sicer opozarjajo na nizko kakovost vključenih študij in potrebo po izvedbi longitudinalnih kliničnih študij. Prav tako opozarjajo, da je ob večji dostopnosti teh storitev v zunanjih lekarnah treba pokazati predvsem enakovrednost kliničnih izidov glede na običajno oskrbo (5).

7. IZZIVI IZVEDBE TESTOV OB PREISKOVANCU V ZUNANJIH LEKARNAH

Izvedba testov ob preiskovancu v zunanjih lekarnah s seboj prinaša številne izzive, ki jih je treba nasloviti ob implementaciji storitev:

Dojemanje farmacevtov kot kliničnih zdravstvenih delavcev

V ZDA, Kanadi, Združenem kraljestvu in Avstraliji farmacevti že izvajajo vrsto dodatnih storitev, kot so cepljenja, predpisovanje, pregledi zdravil, zaradi česar jih pacienti prepoznavajo kot kompetentne klinične zdravstvene strokovnjake. Veliko raziskovalcev ugotavlja, da je prelomnico v dojemanju predstavljala ravno uvedba storitve cepljenja, ki jo opravi farmacevt v lekarni. V državah, kjer farmacevti teh vlog še nimajo, so lekarniške storitve in farmacevti videni kot bolj usmerjeni k poslu ali produktu kot pa k pacientu. To lahko predstavlja enega večjih izzivov pri implementaciji razširjenih storitev, kot so testi ob preiskovancu (4, 14).

Pomanjkanje standardiziranega izobraževanja na področju testov ob preiskovancu za farmacevte

Farmacevti potrebujejo za kakovostno in učinkovito izvedbo testov specifično izobraževanje o izvedbi testov, interpretaciji in komunikaciji rezultatov, pomanjkljivostih testov, dobri laboratorijski praksi in vodenju dokumentacije. V raziskavah so tudi farmacevti sami poudarjali pomanjkljivo znanje. Tako izobraževanje seveda lahko predstavlja tudi znaten strošek implementacije testov ob preiskovancu. Po drugi strani pa postajajo testi vse bolj preprosti za izvedbo, prav tako narašča količina izobraževalnega materiala, ki je na voljo na spletu, in nenazadnje tudi neposredna dostopnost za uporabnika samega (3, 5, 14).

Integracija storitve v delovne procese

Izvedba testov ob preiskovancu je časovno precej zahtevna. Celotna obravnava pacienta skupaj s testom je v ZDA trajala v povprečju 25 min, v Franciji pa okoli 15 min. To zahteva prilagoditve ostalih procesov, saj bi sicer morali drugi pacienti na storitve čakati bistveno dlje časa. Dodatno zaposlovanje farmacevtov bi problem omililo, vendar pogosto te možnosti ni (10, 14).

Infrastruktura v lekarni

Za uspešno izvedbo testov ob preiskovancu je potrebna ločena soba za svetovanje, da je zagotovljena zasebnost pacienta. Prav tako so potrebni ustrezni prostori za zbiranje vzorcev, izvedbo testov in varno odstranjevanje odpadkov (5, 8, 14).

Stroški testov ob preiskovancu

Ena izmed največjih ovir za široko vpeljavo testov v lekarniškem okolju je ekonomske narave. Implementacija storitve predstavlja številne stroške: nakup opreme, izvedba izobraževanja, testni material, delo farmacevta, prilagoditve prostorov, oglaševanje storitev. Zavarovalnice so pogosto zadržane do poplčila takih stroškov, dokler ni demonstrirana raven povpraševanja in koristi takih storitev. Hohmeier in sod. so v raziskavi ugotavljali pripravljenost pacientov za plačilo takih stroškov v ZDA. Izkazalo se je, da so tisti, ki so preferirali izvedbo testov ob preiskovancu v lekarni, za storitev bili pripravljeni plačati več (75 % anketirancev je bilo pripravljenih plačati 50 \$ ali več). Predvsem je šlo za mlajšo populacijo (20–34 let). Vendar je to odvisno tudi od zdravstvenega sistema. V državah, kjer je zdravstveni sistem javno financiran, pacienti storitve niso pripravljeni plačati iz svojega žepa. Za uspešno implementacijo storitve je zato plačilo stroškov izziv, ki ga je nujno treba aktivno naslavljati od pilotnih študij naprej (1, 2, 14, 20).

Upravljanje s pridobljenimi podatki

Testi ob preiskovancu dajejo osebne podatke o zdravstvenem stanju pacientov, zato je pomembno zagotavljanje varne hrambe, prenosa in dostopa do teh podatkov. Prav tako je pomembno poskrbeti za povezljivost pridobljenih podatkov s pacientovo kartoteko, ki bi tako bili na voljo zdravstvenim delavcem, ki zagotavljajo oskrbo pacienta (3, 6).

Zavedanje pacientov o storitvah

Pacienti teh storitev večinoma še ne poznajo in se pogosto ne zavedajo, da so na voljo v lekarnah. Zato je potrebno aktivno oglaševanje v časopisih, prek oglasov, letakov ipd. (2, 14).

Vzpostavitev sistema nadzora in vodenja kontrole kakovosti

Testi ob preiskovancu so del laboratorijske dejavnosti, za katero veljajo enake zahteve kakovosti kot za medicinske laboratorije. Tako se morajo izvajati v skladu s predpisi in standardi v vzpostavljenem sistemu kakovosti. Za dobro celovito organiziranost laboratorijske dejavnosti je potrebna uskladitev testiranja ob preiskovancu in medicinskega laboratorija. Odgovornost za uvedbo in nadzor ima v ožjem strokovnem pogledu medicinski laboratorij z dovoljenjem za delo oziroma specialist ustrezne laboratorijske stroke, in to ne glede, ali izvajamo teste ob preiskovancu v bolnišnicah, zdravstvenih domovih ali lekarnah (7).

Sodelovanje z drugimi zdravstvenimi delavci

Za uspešno izvedbo testov ob preiskovancu v lekarni je kritično zagotoviti usklajevanje z zdravniki in strokovnjaki laboratorijske stroke. Zdravstveni delavci, ki obotavljajo ali si ne želijo take vrste sodelovanja, lahko ovirajo implementacijo storitev. Zlasti se to dogaja, če se ne zavedajo farmacevtovih sposobnosti in trenutnih priložnosti na tem področju. Raziskave sicer kažejo, da so drugi zdravstveni delavci odprti za dogovore o skupni storitvi, kadar so že vzpostavljeni predhodni dobri odnosi s farmacevti. Kontinuirano gojenje takšnih odnosov je zato ključnega pomena za uspeh izvedbe storitev. Skupaj z zdravniki in strokovnjaki laboratorijske stroke je treba razviti lokalne sporazume in protokole za zagotovitev medsebojnega zaupanja, usklajenosti procesov in odgovornosti (1, 2, 5, 13, 14).

Drugo

V specifičnih zdravstvenih okoljih se farmacevti srečujejo tudi z drugimi izzivi. V nekaterih državah striktna zakonodaja farmacevtom preprečuje razširitev njihovih vlog. V Romuniji in Ukrajini tako farmacevti ne smejo ravnati z biološkimi vzorci (npr.

krvjo). V Belgiji in na Nizozemskem naj bi se farmacevti izogibali dotikanju pacientov, kar otežuje izvedbo testov ob preiskovancu. Ponekod si pacienti takih storitev ne želijo v zunanjih lekarnah, pač pa v zdravniških ordinacijah (16, 21).

8. ZAKLJUČEK

Testi ob preiskovancu predstavljajo eno izmed novih vlog, ki jih kot klinični strokovnjaki prevzemajo lekarniški farmacevti. V nekaterih evropskih državah in v ZDA, kjer imajo že zgodovino širitve vlog farmacevta, so ti testi že del običajne lekarniške prakse, drugod si šele utirajo pot. Kljub številnim izzivom pri implementaciji tovrstnih storitev predstavlja večji klinični angažma prihodnost farmacevtskega poklica, saj s tem potrjujemo svojo zavezanost biti usmerjeni v dobrobit pacientov.

LITERATURA

1. Steltenpohl EA, Barry BK, Coley KC, et al. Point-of-Care Testing in Community Pharmacies: Keys to Success From Pennsylvania Pharmacists. *J Pharm Pract.* 2018; 31(6): 629-35.
2. Klepser DG, Klepser ME. Point-of-care testing in the pharmacy: how is the field evolving? *Expert Rev Mol Diagn.* 2018; 18(1): 5-6.
3. Cooke J, Hansen RN, Price CP. Point-of-care testing in the community pharmacy: Improving access to care. <https://www.lumiradx.com/us-en/kc/learning-center/point-of-care-testing-in-the-community-pharmacy>.
4. Kehrer JP, James DE. The Role of Pharmacists and Pharmacy Education in Point-of-Care Testing. *Am J Pharm Educ.* 2016; 80(8): 129.
5. Albasri A, Van den Bruel A, Hayward G, et al. Impact of point-of-care tests in community pharmacies: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2020; 10(5): e034298.
6. Goble JA, Rocafort PT. Point-of-Care Testing. *J Pharm Pract.* 2017; 30(2): 229-37.
7. Prezelj M, Bratož S. Priporočila za organiziranje in izvajanje laboratorijskih testov ob pacientu (POCT – Point of Care Testing). Ljubljana, 2014.
8. Haggerty L, Tran D. Cholesterol Point-of-Care Testing for Community Pharmacies: A Review of the Current Literature. *J Pharm Pract.* 2017; 30(4): 451-8.
9. PGEU. Annual report 2017: Measuring health outcomes in community pharmacy. Brussels; 2017.
10. Maguire T, McGuckin E, Mawhinney S, et al. The impact of a community pharmacy cough, cold and flu service on antibiotic prescribing and its acceptability. <https://pharmaceutical-journal.com/article/research/the-impact-of-a-community-pharmacy-cough-cold-and-flu-service-on-antibiotic-prescribing>. Datum dostopa: 03. 05. 2021.
11. Larsson A, Greig-Pylypczuk R, Huisman A. The state of point-of-care testing: a European perspective. *Ups J Med Sci.* 2015; 120(1): 1-10.
12. Buss VH, Deeks LS, Shield A, et al. Analytical quality and effectiveness of point-of-care testing in community pharmacies: A systematic literature review. *Res Social Adm Pharm.* 2019; 15(5): 483-95.
13. Hardin R, Roberts P, Hudspeth B, et al. Development and Implementation of an Influenza Point-Of-Care Testing Service in a Chain Community Pharmacy Setting. *Pharmacy (Basel).* 2020; 8(4).
14. Essack S, Bell J, Burgoyne D, Tongrod W, Duerden M, Sessa A, et al. Point-of-Care Testing for Pharyngitis in the Pharmacy. *Antibiotics (Basel).* 2020; 9(11).

15. Kettler H, White K, Hawkes S. Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
16. Soares IB, Imfeld-Isenegger TL, Nabergoj Makovec U, Horvat N, Kos M, Arnet I, et al. A survey to assess the availability, implementation rate and remuneration of pharmacist-led cognitive services throughout Europe. *Res Social Adm Pharm.* 2020; 16(1): 41-7.
17. Geerts AF, De Koning FH, De Vooght KM, Egberts AC, De Smet PA, van Solinge WW. Feasibility of point-of-care creatinine testing in community pharmacy to monitor drug therapy in ambulatory elderly patients. *J Clin Pharm Ther.* 2013; 38(5): 416-22.
18. Risoy AJ, Kjome RLS, Sandberg S, Solvik UO. Risk assessment and HbA1c measurement in Norwegian community pharmacies to identify people with undiagnosed type 2 diabetes - A feasibility study. *PLoS One.* 2018; 13(2): e0191316.
19. Orvim Solvik U, Risoy AJ, Kjome RLS, Sandberg S. Quality Control of Norwegian Pharmacy HbA1c Testing: A Modest Beginning. *J Diabetes Sci Technol.* 2018; 12(4): 753-61.
20. Hohmeier KC, Loomis B, Gatwood J. Consumer perceptions of and willingness-to-pay for point-of-care testing services in the community pharmacy. *Res Social Adm Pharm.* 2018; 14(4): 360-6.
21. Brewer A, Hanna C, Eckmann L, Schadler A, Divine H. Patient awareness, willingness, and barriers to point-of-care hepatitis C screening in community pharmacy. *J Am Pharm Assoc (2003).* 2018; 58(4S): S69-S72 e1.

SISTEMI ZA MERJENJE GLUKOZE IN MAŠČOB V KRV

asist. dr. Boštjan Martinc, mag. farm., spec.

Javni zavod Lekarna Ljubljana, Lekarna Mirje

Nacionalni koordinator za diabetes pri Lekarniški Zbornici Slovenije

POVZETEK

Za spremljanje urejenosti kroničnih bolezni, kot sta sladkorna bolezen in pogosto pridružena dislipidemija, je ključnega pomena redno izvajanje samokontrole koncentracije glukoze in maščob v krvi. V zadnji polovici stoletja smo priča naglemu tehnološkemu razvoju sistemov, namenjenih samotestiranju. Le-ti so vedno bolj natančni, točni, specifični, enostavni za uporabo in rokovanje ter vedno manj invazivni. Z možnostjo izvajanja samokontrole se je bistveno izboljšalo sodelovanje bolnika v procesu zdravljenja, s tem pa stae sje pomembno izboljšalao samo preživetje ter z zdravjem povezana kakovost bolnikovega življenja. Za učinkovito uporabo sistemov za samotestiranje je ključnega pomena ustrezno izobraževanje bolnika z namenom pravilne uporabe merilnikov in posledično minimizacijo dejavnikov tveganja, ki lahko negativno vplivajo na točnost in natančnost rezultatov meritev.

1. UVOD

Sladkorna bolezen je najpogostejša kronična nenalezljiva bolezen, za katero je značilna visoka stopnja obolevnosti in umrljivosti. Kot taka predstavlja velik zdravstveni in socialni problem. Po podatkih mednarodnega združenja diabetikov (*IDF – International Diabetes Federation*) je bilo leta 2019 na svetu okrog 463 milijonov bolnikov s sladkorno boleznijo v starosti med 20 in 79 let, kar predstavlja 9,3 % celotne populacije. Poleg tega naj bi bilo več kot 50 % bolnikov nediagnosticiranih. Skrb vzbujajoč je tudi podatek o nagli rasti stopnje prevalence. Napovedi IDF kažejo, da bo do leta 2030 sladkornih bolnikov po vsem svetu okrog 578 milijonov, kar predstavlja 51% rast (1).

Sladkorna bolezen je stanje kronične hiperglikemije (2). Za postavitve diagnoze in kasneje spremljanje urejenosti glikemije je ključnega pomena določanje koncentracije glukoze v krvi. Raven glukoze v krvi je odvisna od številnih dejavnikov, predvsem od vrste in količine zaužite hrane in pijače, telesne aktivnosti, prisotnosti akutnih bolezenskih stanj in stresa ter nenazadnje odmerkov antidiabetičnih zdravil (3).

Pogosto bolnika s sladkorno boleznijo spremljata tudi arterijska hipertenzija in diabetična dislipidemija, ki skupaj povečujeta kardiovaskularno ogroženost bolnika. Za zmanjšanje umrljivosti, podaljšanje preživetja in izboljšanje kakovosti življenja bolnika je zato ključnega pomena multifaktorski pristop k zdravljenju, ki je osnovan na določanju in spremljanju krvnega tlaka ter koncentracije glukoze in maščob v krvi (4–8).

2. POMEN SPREMLJANJA KONCENTRACIJE GLUKOZE V KRVIS SAMOTESTIRANJEM

Z dobro urejenostjo glikemije lahko v veliki meri preprečimo oziroma odložimo pojav kroničnih zapletov na kasnejše obdobje ter tako podaljšamo preživetje bolnika in znatno izboljšamo njegovo z zdravjem povezano kakovost življenja. Izvajanje samokontrole je ključnega pomena za opolnomočenje bolnika s sladkorno boleznijo, ki se prek spremljanja koncentracije glukoze bolje spozna z naravo sladkorne bolezni in odzivi organizma na različne spremembe ter tako doseže boljše sodelovanje v procesu zdravljenja. Izvajanje samokontrole pa služi tudi kot pomemben vir podatkov za zdravnika ter ostalo zdravstveno osebje pri optimizaciji in prilagajanju terapije ter načrtovanju ustreznega življenjskega sloga. V skladu s smernicami za zdravljenje sladkorne bolezni je izvajanje samokontrole krvne koncentracije glukoze treba redno izvajati pri bolnikih, ki se zdravijo z inzulinom, lahko pa je koristno tudi pri bolnikih, ki še niso na inzulinu in prejemajo peroralno terapijo, oziroma tudi pri tistih, ki terapije še ne prejemajo (4, 5).

3. SISTEMI ZA MERJENJE GLUKOZE V KAPILARNI KRVI

Osnova glukometra je biosenzor, ki za prepoznavanje analita izkorišča specifičen encim, čemur sledi fotometrijska ali elektrokemična detekcija produkta reakcije. Pri določanju koncentracije glukoze se uporabljajo predvsem encimski amperometrični elektrokemični glukozni biosenzorji – odlikujejo jih visoka analitska občutljivost, dobra ponovljivost, enostavno vzdrževanje ter nizke cene (9). Poleg tega je njihova prednost majhna količina kapilarne krvi za izvedbo analize. Pri elektrokemični detekciji dodatno ni dejavnika subjektivnosti, ki je prisoten pri merjenju s fotometričnimi glukometri (treba je primerjati barvo testnega traku z lestvico). Res pa je, da so glukometri z elektrokemično detekcijo dražji (9).

3.1. Encimski sistemi

V splošnem določanje koncentracije glukoze temelji na interakciji glukoze z enim izmed treh encimskih sistemov: glukoza oksidaza (GOx), glukoza dehidrogenaza (GDH) in heksokinaza (HEX) (9–12). Metoda s HEX je referenčna metoda za določanje koncentracije glukoze z uporabo spektrofotometrije v večini medicinskih laboratorijev. Je visoko specifična, natančna, hitra in zajema široko koncentracijsko območje ter ima manj interferenc kot metoda z GOx (10). Metode, ki se uporabljajo v glukometrih za samokontrolo glukoze v domačem okolju, v glavnem delujejo na naslednjih dveh encimskih sistemih: GOx in GDH. Encima se razlikujeta v redoks potencialu, potrebnih kofaktorjih, hitrosti reakcije in selektivnosti za glukozo (12).

3.1.1. Metoda s heksokinazo (HEX)

Pri tej metodi se glukoza s pomočjo adenzin trifosfata (ATP) fosforilira do glukoza-6-fosfata. Reakcijo katalizira encim heksokinaza. Nastala glukoza-6-fosfat se nato oksidira z glukoza-6-fosfat-dehidrogenazo, ob tem se nikotin amid dinukleotid fosfat (NADP⁺) pretvarja v NADPH₂, količino katerega merimo pri valovni dolžini 340 nm. Vzorec ne sme biti hemoliziran, saj analizo motijo encimi in fosfatni estri iz eritrocitov. Rezultate analize lahko motijo tudi bilirubin in lipemični vzorec (12).

3.1.2. Metoda z glukoza oksidazo (GOx)

Pri tej metodi se glukoza ob prisotnosti encima GOx oksidira do glukonske kisline. Pri tem nastaja H₂O₂, ki v prisotnosti peroksidaze oksidira kromogen FADH₂ v obarvano spojino flavin adenin dinukleotid (FAD), katerega intenziteto merimo pri valovni dolžini 450 nm. Reakcija oksidacije glukoze je specifična za β-D-glukozo, zato je v reagentu še encim mutarotaza, ki pospeši prehajanje med oblikama α in β. Oksidacija kromogena s H₂O₂ je nespecifična, motijo jo urati, kreatinin, askorbinska kislina, bilirubin, ki lažno znižajo rezultate, oksidanti pa povzročijo lažno zvišanje rezultata (9, 10, 12). GOx je standardni encim za glukozne biosenzorje, zanjo je značilna nekoliko

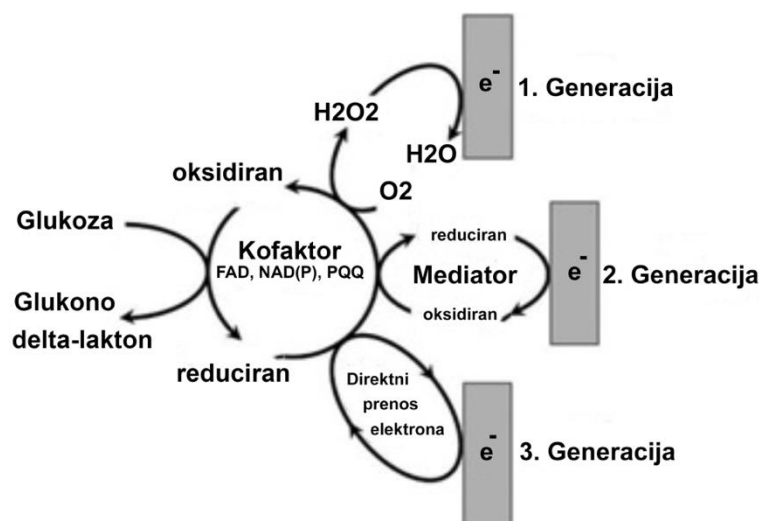
večja selektivnost za glukozo v primerjavi z GDH. GOx vzdrži večje ekstreme v pH-vrednostih, ionski moči in temperaturi kot katerikoli drugi encim. Vse to pomeni enostavnejše pogoje pri proizvodnem procesu, shranjevanju testnih lističev in rokovanju z glukometrom (9, 12).

3.1.3. Metoda z glukoza dehidrogenazo (GDH)

Encim katalizira le prehod β -D-glukoze v lakton, zato je v reagentu še encim mutarotaza, ki pospeši prehajanje med oblikama α in β . Pri nastanku laktone se ob prisotnosti nikotinamid adenin dinukleotida (NAD^+) le-ta pretvori v NADH_2 , nastanek tega pa se meri pri valovni dolžini 365 nm (9, 11). V okviru amperometrične elektrokemične detekcije je prišlo do razvoja in izpopolnjenja številnih redoks kofaktorjev, kot sta na primer: pirokinolin kinon (PQQ), nikotinamid adenin dinukleotid (NAD). Pri uporabi PQQ je encimska reakcija z GDH neodvisna od prisotnosti kisika. GDH-PQQ je posebno učinkovit encimski sistem, ki omogoča izjemno hiter prenos elektronov, je pa relativno drag (10, 12).

3.2. Generacije biosenzorjev

Pri elektrokemičnem določanju koncentracije glukoze imamo tri možnosti detekcije: lahko merimo porabo kisika, nastanek H_2O_2 ali direktno prenos elektronov preko difuzibilnega ali imobiliziranega mediatorja pri oksidaciji H_2O_2 na platinasti elektrodi (Slika 1). Odsotnost redoks mediatorjev nudi biosenzorje z visoko selektivnostjo (9, 12).



Slika 1: Prikaz principov delovanja prve, druge in tretje generacije biosenzorjev. Elektrone, ki nastanejo pri oksidaciji glukoze, prevzame encimski kofaktor in jih prenese bodisi do kisika (prva generacija), elektronskega mediatorja (druga generacija) ali direktno do elektrode (tretja generacija).

3.2.1. *Prva generacija biosenzorjev*

Prva generacija biosenzorjev je delovala na principu spremljanja porabe naravno prisotnega kisika in detekciji nastajanja H₂O₂. Določanje koncentracije nastalega H₂O₂ je bilo enostavno in je omogočalo vgradnjo v majhen, priročen aparat. Omejitev prve generacije biosenzorjev je bila, da je meritev za doseganje visoke selektivnosti potrebovala visoko napetost. Selektivnost določanja H₂O₂ so namreč motile snovi, kot so askorbinska kislina, sečna kislina in določena zdravila. Dodatna slabost je bila omejena topnost kisika v bioloških tekočinah, ki je bila odgovorna za neponovljivost dobljenih rezultatov meritev (12).

3.2.2. *Druga generacija biosenzorjev*

V drugi generaciji so kisik zamenjali redoks mediatorji, ki kot akceptorji elektronov omogočajo prenos elektrona od encima k delovni elektrodi. Pojavila se je kopica redoks mediatorjev: ferocen, fericianid, kinini, tetratiafulvalen, tetracianokinodimetan, tionin, metilen modro in metil viologen. Ferocen je izpolnjeval kriterije odličnega redoks mediatorja: ne reagira s kisikom, je stabilen v reducirani in oksidirani obliki, neodvisen od pH, izkazuje reverzibilno kinetiko prenosa elektrona in hitro reagira z encimom (9, 12).

3.2.3. *Tretja generacija biosenzorjev*

V nadaljevanju so še naprej sledila nova prizadevanja za še večjo pospešitev prenosa elektrona iz encima na delovno elektrodo in odstranitve toksičnih redoks mediatorjev (9). Tretja generacija biosenzorjev temelji na direktnem prenosu elektronov iz encima na delovno elektrodo brez vmesnih členov redoks mediatorjev. Ti biosenzorji so že primerni za vgradnjo v sisteme za kontinuirano spremljanje krvne koncentracije glukoze, ki so predstavljeni v poglavju 7. Za prenos elektronov pri GDH-PPQ se uporabljajo organske soli, kot je tetratiafulvalen-tertacianokinodimetan, pri GOx pa flavoproteini (9, 10).

3.3. **Pravilna uporaba glukometra**

Pred opravljanjem vsakokratne meritve glukoze si mora bolnik temeljito umiti roke, jih dobro obrisati in osušiti ter predvideni del mesta vboda z lanceto (blazinica tretjega ali četrtega prsta) razkužiti z antiseptično raztopino (70 % raztopina izopropanola ali alkoholni robček). Mesto nato osušimo s sterilno gazo, saj v nasprotnem primeru neodstranjen alkohol bolniku povzroča večjo zaznavo bolečine ob vbodu, kontaminira vzorec krvi, povzroča hemolizo eritrocitov in prepreči tvorbo polne, okrogle kapljice krvi. Zaželeno je, da se mesto vboda redno menja, ker bo zbadanje tako manj boleče, poleg tega pa se v večji meri izognemo zadebelitvi kože in sčasoma njeni neobčutljivosti na različne dražljaje (13).

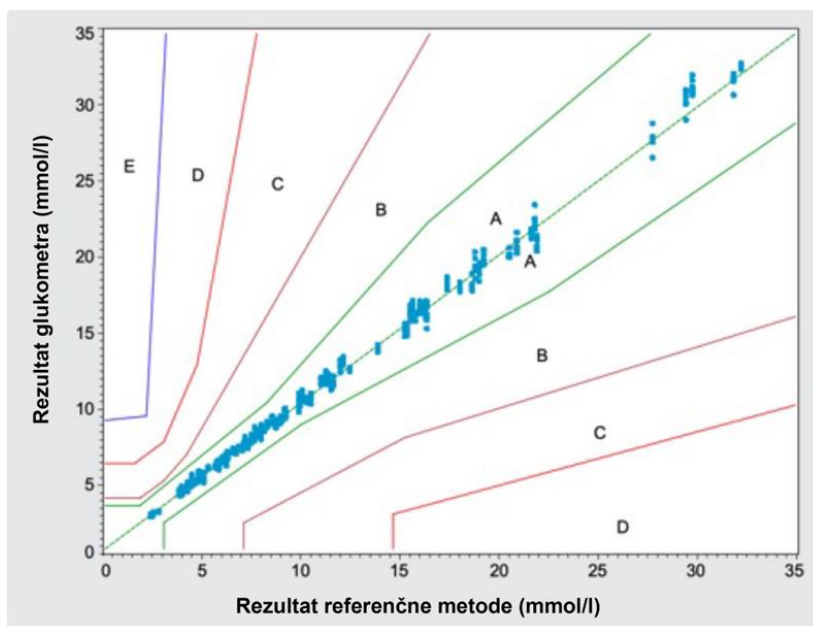
Prvo kapljico krvi moramo odstraniti s sterilno gazo in počakati, da se pojavi druga. Vbodnega mesta ne stiskamo zaradi možnosti mešanja krvi s tkivno tekočino. Prva kapljica krvi zaradi hemolize eritrocitov in prisotnosti tkivne tekočine ter delčkov kože ne odraža dejanske koncentracije glukoze v kapilarni krvi. Testni trak je treba že predhodno vstaviti v merilnik. Nato se s posebej označenim mestom testnega traku približamo kapljici krvi na prstu, kjer naprava samodejno s kapilarnim vlekem povleče zadostno količino kapilarne krvi. Če je kapljica krvi premajhna, okolno tkivo prsta nežno masiramo v smeri od dlani h konici prsta ter roko obrnemo navzdol in ponovimo postopek nanosa krvi na testni trak. Po odvzemu krvi rano ponovno obrišemo z antiseptikom ter prelepimo s sterilno gazo, dokler se krvavitev popolnoma ne ustavi (13). Vsebnik mora biti ves čas tesno zaprt, da preprečimo dotok zraka, vlage in izpostavljenost sončni svetlobi. S tem zagotovimo deklarirano uporabnost testnih lističev (13).

Kapilarna kri je zmes arterijske krvi, venske krvi, znotrajcelične tekočine (celice počijo med punkcijo kapilar) in intersticijske tekočine. Koncentracija glukoze je običajno v kapilarni krvi nekoliko višja kot v venski krvi – razlike običajno zanemarimo, saj naj ne bi presegale 5 %. Pomemben je še časovni zamik. Po obroku se koncentracija glukoze v krvi poveča najprej v venski krvi, sledi kapilarna kri in nato intersticijska tekočina (10, 11).

3.4. Točnost in natančnost glukometrov

Za zagotavljanje visoke stopnje kakovosti delovanja glukometrov v vsakodnevnem okolju morajo moderni glukometri ustrezati mednarodnim harmoniziranim zahtevam za natančnost sistemov za spremljanje koncentracije glukoze v krvi v primeru samotestiranja, ki so predpisane z mednarodnim standardom ISO 15197:2013 (v Evropski uniji usklajen kot EN ISO 15197:2015) (14). Glede natančnosti določanja glukoze v okviru samotestiranja so določena naslednja merila (14–17):

- vsaj 95 % meritev, opravljenih z glukometrom, mora biti v območju $\pm 0,83$ mmol/L pri koncentracijah glukoze $< 5,56$ mmol/L in znotraj ± 15 % pri $\geq 5,56$ mmol/L;
- pri analizi napak mora biti vsaj 99 % rezultatov znotraj cone A in B Parkerjeve mreže napak pri sladkorni bolezni tipa 1 (Slika 2).



Slika 2: EN ISO = 15197:2015 predpisuje, da mora biti 99 % rezultatov meritev znotraj cone A in B Parkerjeve mreže napak pri sladkorni bolezni tipa 1. Cona A: ni vpliva na klinični izid; Cona B: brez vpliva ali minimalen vpliv na klinični izid; Cona C: srednje velik vpliv na klinični izid; Cona D: velik vpliv na klinični izid – lahko predstavlja pomembno zdravstveno tveganje; Cona E: zelo velik vpliv na klinični izid – lahko ima nevarne posledice za zdravje (14, 17).

3.4.1. Dejavniki, ki vplivajo na točnost in natančnost glukometrov

Vsi člani zdravstvenega tima kot tudi bolnik sam moramo poznati dejavnike tveganja, ki lahko vplivajo na neustreznost meritev koncentracije glukoze z uporabo glukometrov, namenjenih izvajanju samokontrole. Gre za dejavnike, ki so posledica človeških napak, napak glukometra, napak testnih lističev, dejavnikov okolja, fizioloških dejavnikov in sočasno apliciranih zdravilnih učinkovin (Preglednica 1). Tveganje za napačno interpretacijo rezultata meritve lahko minimiziramo z natančnim poznavanjem vpliva naštetih dejavnikov tveganja (11, 15).

Preglednica 1: Dejavniki, ki lahko vplivajo na rezultate meritev samotestiranja krone koncentracije glukoze (11, 15).

Človeški dejavniki	Neppravilno rokovanje z glukometrom Neppravilna izvedba kodiranja glukometra Neppravilno shranjevanje in uporaba testnih lističev Neustrezno izobraževanje bolnika
Glukometer	Natančnost, točnost, specifičnost Enostavnost za uporabo
Testni trakovi	Variabilnost med serijami lističev in/ali posameznimi lističi iste serije
Okoljski dejavniki	Temperatura Vlažnost Nadmorska višina Elektromagnetsko sevanje
Fiziološki dejavniki	Pretok periferne krvi Hematokrit Parcialni tlak kisika v krvi (pO ₂) Trigliceridi Bilirubin Sečna kislina
Zdravilne učinkovine	Askorbinska kislina (i.v. aplikacija) Paracetamol Dopamin Manitol

Na podlagi študij potencialnih napak pri izvajanju samotestiranja je bilo ugotovljeno, da > 90 % napak izvira iz predanalitične faze (Preglednica 2) (11, 15). Gre za nepravilno rokovanje z glukometrom. Ker so volumni vzorcev krvi zelo majhni (0,3–1 µl), lahko že minimalna kontaminacija vzorca z najrazličnejšimi tekočinami, ki vsebujejo glukozo, močno vpliva na rezultat meritve. Največkrat gre za kontaminacijo s sadjem ali ostanki sadnih sokov na konicah prstov pred vbodom z lanceto, če si bolnik pred izvedbo meritve ne umije rok. Naslednji pogosti vir napak je v napačnem kodiranju. Danes so praktično vsi glukometri, ki so na voljo v lekarnah, že predhodno tovarniško umerjeni, zato korak kodiranja ni več potreben. Pogost vir napak je tudi uporaba neustreznih testnih lističev. Le-ti so lahko poškodovani ali pa so skladiščeni pri neustreznih pogojih (11, 16), zato je zelo pomembno, da za zmanjšanje možnosti napak pri izvajanju meritev koncentracije glukoze za vsakega bolnika s sladkorno boleznijo izvedemo dobro in učinkovito edukacijo za pravilno uporabo glukometra (15).

Preglednica 2: Pregled potencialnih virov napak pri določanju koncentracije glukoze v krvi z uporabo predosem prve generacije glukometrov (11).

Viri napak	Vpliv na koncentracijo glukoze
Predanalitika	
Nepopoln nanos reagentov na površino testnega lističa	↑↓
Poškodovana površina testnega, kalibracijskega ali kontrolnega lističa	↑↓
Izpostavljenost testnih lističev neprimernim temperaturam tekom skladiščenja	↑
Pretečen rok uporabe testnih lističev	↑↓
Testiranje pri visokih koncentracijah glukoze v krvi	↑ (GOx)
Bolnik	
Hrana ali zdravila z visoko vsebnostjo galaktoze	↑ (GDH-PQQ)
Hrana ali zdravila z maltozo ali ksilozo	↑ (GDH-PQQ)
Hrana z velikimi količinami vitamina C	↑ ali ↓ (samo pri GDH)
Askorbinska kislina	↓ (GOx in GDH)
Paracetamol	↓ (GOx) in ↑ (GDH)
L-DOPA	↑ ali ↓ (GOx)
Visok hematokrit	↓
Nizek hematokrit	↑
Visoka koncentracija trigliceridov v krvi	↓ (GOx)
Nizka koncentracija kisika v krvi	↑ (GOx)
Visoka koncentracija sečne kisline v krvi	↓ (GOx)
Analitika	
Napačno kodiranje, napačen kalibracijski ali testni trak	↑ ali ↓
Kontaminacija mesta vzorčenja na testnem traku	↑
Nezadostna količina krvi v testnem polju	↓
Testni trak ni dovolj globoko vstavljen v glukometer	↓
Prevelika količina vzorca na testnem traku	↑
Postanalitična faza	
Napaka pri branju rezultata z zaslona	↑ ali ↓

GDH – glukoza dehidrogenaza, GOx – glukoza oksidaza, PQQ – pirolokinolin kinon

Z vidika napak, ki nastajajo pri sami uporabi glukometra, je izjemno pomembno, da je le-ta čim enostavnejši za uporabo (s čim manjšim številom potrebnih korakov za izvedbo meritve), enostaven za rokovanje (majhen, v velikosti dlani, z gumijastimi robovi za dober oprijem) in ima dovolj velik, osvetljen in pregleden zaslon za nedvoumen odčitek rezultata meritve. K zmanjšanju možnosti napak so v zadnjih letih doprinesle izboljšave, kot so tovarniška avtokalibracija, avtomatsko prepoznavanje pretečenih lističev, avtomatsko prepoznavanje nanosa premajhne količine vzorca krvi, avtomatska detekcija izpostavljenosti testnih lističev neustreznim pogojem shranjevanja, obarvana mesta za nanos vzorca, vgrajeni algoritmi za korekcijo rezultata glede na vrednosti hematokrita idr. Pomembna izboljšava sodobnih glukometrov je tudi vgrajena programska oprema, ki shranjuje ogromno število podatkov, kar omogoča tabelarično in/ali grafično obdelavo, izračun 7-, 14-, 30- ali 90-dnevne povprečne vrednosti glikemije. Nekateri od njih lahko tudi ločeno prikazujejo vrednosti koncentracije glukoze na tešče in po jedi oziroma telesni aktivnosti ter preračunajo potreben odmerek inzulina glede na izmerjeno vrednost sladkorja. Možni so tudi različni načini prenosa podatkov, bodisi na pametne naprave ali računalnike, kjer jih lahko nadalje obdelujemo.

4. KONTINUIRANO SPREMLJANJE KONCENTRACIJE GLUKOZE

4.1. Spremljanje koncentracije glukoze v realnem času

Nov mejnik v urejenosti glikemije v okviru zdravljenja sladkorne bolezni predstavlja možnost kontinuiranega spremljanja koncentracije glukoze (*CGM – continuous glucose monitoring*). Prvi profesionalni sistem za kontinuirano spremljanje krvne koncentracije glukoze je FDA odobrila leta 1999. Danes ti sistemi predstavljajo majhno napravo, ki je običajno vstavljena podkožno na področju trebuha ali roke ter na osnovi elektrokemične detekcije vsakih 1–5 minut odčita koncentracijo glukoze v intersticijski tekočini in odčitek pošlje na računalnik ali drugo elektronsko napravo. Na osnovi meritev je možno spremljanje urejenosti in morebitnih trendov spreminjanja glikemije, poleg tega naprava zazna in opozori na ekstremne odklone koncentracije glukoze (hipoglikemije ali pretirane hiperglikemije). Alarme oddaja sprejemniku, ki je lahko tudi pametna zapestna ura ali mobilni telefon. Uvedba kontinuiranega spremljanja koncentracije glukoze znatno zmanjša problematiko zbadanja. Določitev koncentracije glukoze v kapilarni krvi je potrebna samo še 2-krat dnevno za namen umerjanja sistema. Zbadanje je potrebno še v primeru, ko bolnikova simptomatika ne korelira z odčitanimi vrednostmi glukoze, saj je problem časovnega zamika med spremembo koncentracije glukoze v intersticijski tekočini in v venski krvi prisoten tudi pri tem sistemu (10, 11). V letošnjem letu je prišel na slovensko tržišče tudi nov, izpopolnjen sistem (Dexcom G6), pri katerem tudi redno 2-krat dnevno zbadanje za namen umerjanja naprave ni več potrebno.

4.2. Spremljanje koncentracije glukoze v poljubnem trenutku (»flash sistem«)

V tem primeru gre za določanje koncentracije glukoze v intersticijski tekočini s pomočjo glukoznega sensorja in ročnega čitalnika. Glukozni senzor za enkratno uporabo (14 dni) nosimo nalepljen na koži nadlakti, z ročnim čitalnikom pa odčitamo vrednost koncentracije glukoze v medceličnini vsakič, ko ga prislonimo k sensorju. Zbadanje in določanje kapilarne koncentracije glukoze za izvedbo umerjanja sistema ni več potrebno. Zaradi časovne zakasnitve (5–6 minut), pri kateri koncentracija glukoze v intersticijski tekočini odraža dejansko koncentracijo glukoze v krvi, pa je določanje koncentracije glukoze v kapilarni krvi vseeno še potrebno, in sicer v primerih, ko se vrednosti koncentracije glukoze v krvi hitro spreminjajo oziroma ko bolnikova simptomatika ne korelira z odčitanimi vrednostmi glukoze. »Flash sistem« tako predstavlja neke vrste hibrid med kontinuiranim spremljanjem koncentracije glukoze v realnem času in določanjem koncentracije glukoze v krvi na osnovi meritev kapilarne krvi (11, 18). Prednosti »flash sistema« pred kontinuiranim spremljanjem koncentracije glukoze sta veliko nižja cena in tovarniška umeritev sistema. Slabosti tovrstnega sistema so nezmožnost kontinuiranega spremljanja koncentracije glukoze, kontinuiranega spremljanja trenda glikemije ter zaznave potencialnih večjih odklonov v koncentraciji glukoze (stanja hipoglikemije, hiperglikemije). Trenutno je na tržišču merilni sistem s »flash tehnologijo« enega samega proizvajalca (Abott). Na tržišče je prišel leta 2014, FDA ga je odobrila leta 2017, na slovensko tržišče pa je dobrodošla novost prišla v letu 2020 (9–11, 18–20).

4.3. Primerjava sistemov za kontinuirano spremljanje koncentracije glukoze

Na tržišču je trenutno več naprav različnih proizvajalcev za kontinuirano spremljanje krvne koncentracije glukoze, katerih karakteristike so prikazane v Preglednici 3 (21).

Preglednica 3: Primerjava različnih naprav za kontinuirano spremljanje krvne koncentracije glukoze vodilnih proizvajalcev tovrstnih naprav (21).

Instrument	Čas⁺	Tip merilca	Starost bolnika	Uporabnost senzorja	Umerjanje	Alarm*
Abbot Freestyle libre	1 h	isCGM	> 18 let	14 dni	Ni potrebno	Ne
DEXCOM G5 Mobile	2 h	rtCGM	> 2 leti	7 dni	Na 12 ur	Da
DEXCOM G6 CGM	2 h	rtCGM	> 2 leti	10 dni	Ni potrebno	Da
MEDTRONICS DIABETES	2 h	rtCGM	> 14 let	7 dni	Na 12 ur	Da
Senseonics Eversence CGM System	24 h	rtCGM	> 18 let	Do 90 dni	Na 12 ur	Da

+ - čas namestitve; *alarm ob ekstremnih koncentracijah glukoze v krvi (hipoglikemija, hiperglikemija); isCGM (intermittently scanned glucose monitoring) – spremljanje v poljubnem trenutku; rtCGM (real-time continuous glucose monitoring) – spremljanje v realnem času.

5. SPREMLJANJE KONCENTRACIJE MAŠČOB V KRVNI

Spremljanje krvne koncentracije holesterola je ključnega pomena za zgodnje odkrivanje dislipidemije in vzdrževanje ustrezne ravni lipidov v krvi za preprečevanje kardiovaskularnih zapletov (22, 23).

Težava pri spremljanju urejenosti diabetične dislipidemije pri nas je v tem, da je na tržišču trenutno sicer več različnih merilnikov krvne koncentracije maščob v krvi za samotestiranje, vendar je velika večina le-teh sposobna določati le celokupno koncentracijo holesterola in trigliceridov v krvi. Omenjeni aparati torej ne omogočajo določanja posameznih frakcij lipoproteinov, LDL- in HDL-holesterola, pri čemer je za dober nadzor nad urejenostjo diabetične dislipidemije ključnega pomena ravno spremljanje krvne koncentracije LDL-holesterola (22, 23). Na tržišču so tudi merilniki, ki omogočajo določanje celotnega lipidograma, vendar je njihova cena trenutno še zelo visoka in posameznemu uporabniku težko dostopna (22). Tudi cena testnih lističev je v primerjavi s spremljanjem koncentracije glukoze bistveno višja. Upoštevajoč dejstvo, da se krvne koncentracije lipidov ne spreminjajo tako hitro kot glukoza in da posledično določanja ravni lipidov v krvi ni smiselno izvajati pogosteje kot 1-krat mesečno, uporaba omenjenih merilnikov za zdaj ni tako zelo razširjena. Princip določanja koncentracije posameznih frakcij lipidov v lipidogramu je v osnovi podoben principu določanja koncentracije glukoze z uporabo testnih lističev in deluje na osnovi kolorimetrične ali elektrokemične detekcije. Točnost in natančnost omenjenih

merilnikov je visoka in ustreza standardu EN ISO 15197:2015 (14). Natančnost meritev za celokupni holesterol je $\geq 97\%$, LDL-holesterol $\geq 96\%$ ter HDL-holesterol $\geq 94\%$ (11, 24).

Z nadaljnjim razvojem in optimizacijo merilnih sistemov in posledičnim znižanjem stroškov izdelave ter hkrati z dodatnim ozaveščanjem bolnikov o pomenu spremljanja krvne koncentracije lipidov bodo omenjeni merilniki v prihodnje najverjetneje enako široko dostopni in uporabljeni, kot so že sedaj merilniki za spremljanje urejenosti glikemije.

6. VLOGA LEKARNIŠKIH FARMACEVTOV

Za dobro vodenje bolezni je ključnega pomena konstantno spremljanje urejenosti glikemije in maščob v krvi. Lekarniški farmacevti lahko tukaj s svojo visoko strokovno usposobljenostjo in enostavno dostopnostjo igramo pomembno vlogo tako pri presejanju kot tudi spremljanju urejenosti motenj v presnovi ogljikovih hidratov in lipidov s pomočjo izvajanja hitrih testov spremljanja krvne koncentracije glukoze, glikiranega hemoglobina in maščob (22).

To poslanstvo v veliki meri že izvajamo, še posebej v sklopu izvajanja programov farmacevtske skrbi. V sklopu sodelovanja pri ozaveščanju javnosti o dejavnih tveganja za kronična obolenja in zgodnjem odkrivanju le-teh se v lekarnah po Sloveniji, v vnaprej določenih terminih, razpisujejo dnevi izvajanja meritev glukoze, glikiranega hemoglobina in maščob v krvi. Ob tem lekarniški farmacevti izvajamo interpretacijo rezultatov meritev in svetovanja glede zdravega življenjskega sloga.

Za ustrezno samokontrolo je ključna pravilnost izvajanja meritev. Kot je bilo že opisano v poglavju 3.4.1., je veliko dejavnikov, ki lahko vplivajo na točnost in natančnost rezultatov meritev, pri čemer imajo največji vpliv napake, do katerih prihaja v predanalitični fazi, pri preprečevanju le-teh pa ima ključno vlogo izobraževanje bolnikov o pravilni uporabi merilnikov in pravilnem postopku izvajanja meritev. Tudi tovrstna svetovanja opravljamo v lekarnah, še zlasti pa ponovno v sklopu izvajanja farmacevtske skrbi.

Podobno je tudi v svetu, kjer imajo lekarniški farmacevti vedno večjo vlogo pri izobraževanju in svetovanju glede pravilne uporabe merilnikov kot tudi pri samem izvajanju hitrih testov in interpretaciji njihovih rezultatov (25–27).

7. ZAKLJUČEK

V prispevku opisane tehnološke novosti v spremljanju koncentracije glukoze in maščob v krvi predstavljajo pomembno olajšanje vsakodnevnega življenja bolnikov ter velik doprinos k boljši urejenosti bolezni in posledično izboljšanju z zdravjem povezane kakovosti življenja bolnika. Na žalost je tehnologija še precej nova, kar ima za posledico visoko ceno, zaradi česar tehnologija še vedno ni splošno dostopna širšemu krogu bolnikov. To je še posebno očitno pri kontinuiranem spremljanju koncentracije glukoze in določanju maščob v krvi.

V bodoče bosta ključni optimizacija in izboljšanje sistemov za kontinuirano spremljanje krvne koncentracije glukoze. Problem tu namreč predstavlja potreba po še vedno prepogostem kontroliranju pravilnosti delovanja sistema s klasičnim spremljanjem kapilarne koncentracije glukoze. Problematična je tudi kratka življenjska doba v podkožje vstavljenih senzorjev zaradi potencialne biološke nekompatibilnosti, razvoja vnetnih stanj in razrasta bakterij. Poleg intersticijske tekočine se pojavljajo nove možnosti implementacije tovrstnih merilnih senzorjev, bodisi v epidermisu ali kot obliži na površini kože. Preučujejo tudi sisteme kontinuiranega spremljanja koncentracije glukoze v krvi s pomočjo senzorjev, ki bi spremljali glukozo v znoju ali v solznih tekočinah. Tehnološki razvoj gre vsekakor v smeri hitrega, enostavnega in zanesljivega spremljanja urejenosti glikemije in lipidov v enostavni, neboleči in cenovno ugodni obliki.

LITERATURA

1. Lemieux, I., Reversing Type 2 Diabetes: The Time for Lifestyle Medicine Has Come! *Nutrients*, 2020. 12(7).
2. Hua, F., New insights into diabetes mellitus and its complications: a narrative review. *Ann Transl Med*, 2020. 8(24): p. 1689.
3. Petersmann, A., et al., Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2019. 127(S 01): p. S1-S7.
4. Sia, H.K., et al., Self-monitoring of blood glucose in association with glycemic control in newly diagnosed non-insulin-treated diabetes patients: a retrospective cohort study. *Sci Rep*, 2021. 11(1): p. 1176.
5. Wen, L., et al., Association between self-monitoring of blood glucose and glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Health Syst Pharm*, 2004. 61(22): p. 2401-5.
6. Petrie, J.R., T.J. Guzik, and R.M. Touyz, Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *Can J Cardiol*, 2018. 34(5): p. 575-584.
7. Piepoli, M.F., et al., 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2016. 69(10): p. 939.
8. Aguiar, C., R. Duarte, and D. Carvalho, New approach to diabetes care: from blood glucose to cardiovascular disease. *Rev Port Cardiol*, 2019. 38(1): p. 53-63.
9. Yoo, E.H. and S.Y. Lee, Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors (Basel)*, 2010. 10(5): p. 4558-76.

10. Lee, H., et al., Enzyme-Based Glucose Sensor: From Invasive to Wearable Device. *Adv Healthc Mater*, 2018. 7(8): p. e1701150.
11. Clarke, S.F. and J.R. Foster, A history of blood glucose meters and their role in self-monitoring of diabetes mellitus. *Br J Biomed Sci*, 2012. 69(2): p. 83-93.
12. Ferri, S., K. Kojima, and K. Sode, Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes. *J Diabetes Sci Technol*, 2011. 5(5): p. 1068-76.
13. Hill, J.H., D.; James, J.; et. al. Blood Glucose Monitoring Guidelines - Consensus Document 2017 [cited 2021 17.5.2021].
14. International Organization for Standardization. *In vitro* diagnostic test systems—requirements for blood-glucose monitoring systems for self-testing in managing diabetes mellitus ISO; 2013.
15. Erbach, M., et al., Interferences and Limitations in Blood Glucose Self-Testing: An Overview of the Current Knowledge. *J Diabetes Sci Technol*, 2016. 10(5): p. 1161-8.
16. Tonyushkina, K. and J.H. Nichols, Glucose meters: a review of technical challenges to obtaining accurate results. *J Diabetes Sci Technol*, 2009. 3(4): p. 971-80.
17. Yu-Fei, W., et al., Accuracy Evaluation of 19 Blood Glucose Monitoring Systems Manufactured in the Asia-Pacific Region: A Multicenter Study. *J Diabetes Sci Technol*, 2017. 11(5): p. 953-965.
18. Bruttomesso, D., et al., The use of real time continuous glucose monitoring or flash glucose monitoring in the management of diabetes: A consensus view of Italian diabetes experts using the Delphi method. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2019. 29(5): p. 421-431.
19. Juska, V.B. and M.E. Pemble, A Critical Review of Electrochemical Glucose Sensing: Evolution of Biosensor Platforms Based on Advanced Nanosystems. *Sensors (Basel)*, 2020. 20(21).
20. Maoz, M., et al., Clinical Implications of Sub-grouping HER2 Positive Tumors by Amplicon Structure and Co-amplified Genes. *Sci Rep*, 2019. 9(1): p. 18795.
21. Ziegler, R., et al., Therapy Adjustments Based on Trend Arrows Using Continuous Glucose Monitoring Systems. *J Diabetes Sci Technol*, 2019. 13(4): p. 763-773.
22. Haggerty, L. and D. Tran, Cholesterol Point-of-Care Testing for Community Pharmacies: A Review of the Current Literature. *J Pharm Pract*, 2017. 30(4): p. 451-458.
23. Grant, P.J. and F. Cosentino, The 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: New features and the 'Ten Commandments' of the 2019 Guidelines are discussed by Professor Peter J. Grant and Professor Francesco Cosentino, the Task Force chairmen. *Eur Heart J*, 2019. 40(39): p. 3215-3217.
24. Bolodeoku, J., Hand-Held Self-Monitoring Blood Cholesterol Devices for the Monitoring of Patients. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 2019: p. 17776-17780.
25. Buss, V.H., et al., Analytical quality and effectiveness of point-of-care testing in community pharmacies: A systematic literature review. *Res Social Adm Pharm*, 2019. 15(5): p. 483-495.
26. Albasri, A., et al., Impact of point-of-care tests in community pharmacies: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, 2020. 10(5): p. e034298.
27. Kehrer, J.P. and D.E. James, The Role of Pharmacists and Pharmacy Education in Point-of-Care Testing. *Am J Pharm Educ*, 2016. 80(8): p. 129.

TESTIRANJE COVID-19: HITRI ANTIGENSKI TESTI IN NOVE METODE

asist. dr. Dunja Urbančič, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo

POVZETEK

Pandemija covid-19 že dobro leto predstavlja resen javno-zdravstveni izziv, katerega vzrok so predvsem hitro prenašanje virusa SARS-CoV-2 v populaciji in možni resni zapleti. Zgodnja diagnoza s hitro detekcijo virusa ima eno ključnih vlog pri preprečevanju širjenja okužbe in pri učinkovitem zdravljenju bolnikov. Za učinkovito zajezitev širjenja okužbe je nujno potrebna vrsta molekularnih in imunoloških diagnostičnih testov, ki bi omogočila hitro določanje virusa tako v bolnišničnem okolju, kot tudi v obliki samotestiranja. Reverzna transkripcija, sklopljena z verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR), je dobro poznana referenčna rutinska metoda za odkrivanje okužb s SARS-CoV-2. V preteklem letu pa so bili razviti številni hitrejši (in občutljivejši) testi za diagnozo covid-19, katerih cilj je učinkovitejši nadzor nad širjenjem okužbe z identifikacijo bolnikov in takojšnjo izolacijo. Mednje sodijo hitri antigenski testi, hitri testi za detekcijo protiteles proti SARS-CoV-2, testi z uporabo izotermne amplifikacije ter pomembno inovativno področje testov, ki za detekcijo SARS-CoV-2 uporabljajo t.i. biosenzorje. V prihodnosti si zato obetamo številne rešitve diagnosticiranja bolezni covid-19 predvsem na področju testiranja ob preiskovancu oz. samotestiranja.

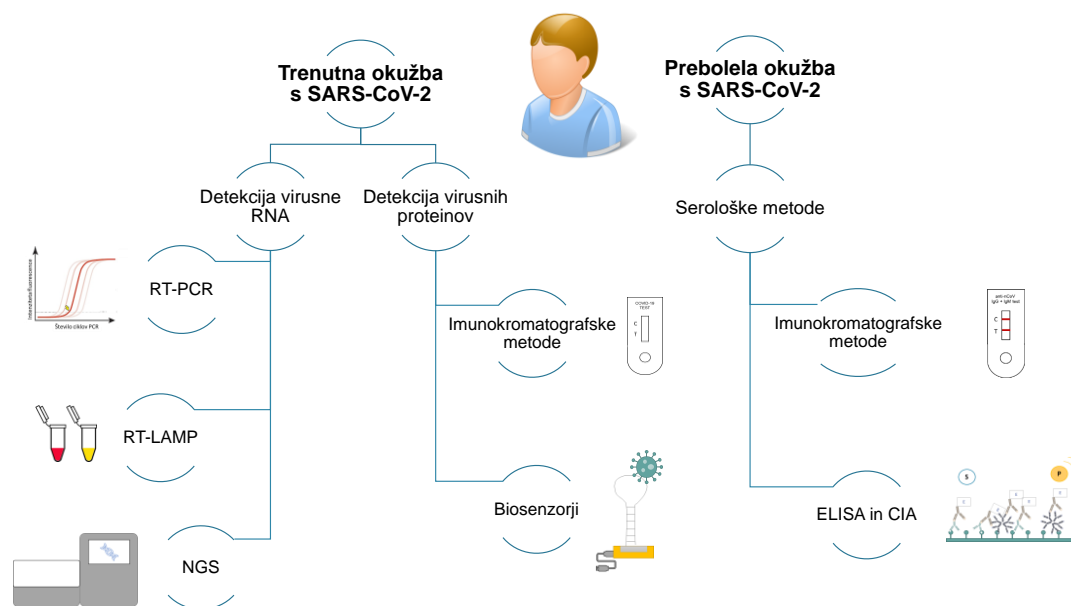
1. UVOD

Januarja 2020 je Kitajski center za nadzor in preprečevanje bolezni identificiral zaporedje novega koronavirusa, ki je konec leta 2019 povzročil vrsto primerov nenavadne pljučnice v Wuhanu na Kitajskem (1). Na podlagi zaporedja genoma je nato ta virus Mednarodni odbor za taksonomijo virusov (ICTV) poimenoval SARS-CoV-2 (*ang. severe acute respiratory syndrome corona virus 2*) (2). Zaradi hitrega širjenja virusa globalnih razsežnosti je Svetovna zdravstvena organizacija razglasila pandemijo in izredno stanje javnega zdravja (1). Od tedaj je v času pandemije za okužbo SARS-CoV-2 zbolelo več kot 150 milijonov svetovnega prebivalstva, zahteval pa je več kot 3 milijone človeških življenj (podatki z dne 2. maja 2021) (3).

SARS-CoV-2 spada med enoverižne RNA viruse z velikostjo genomske RNA 29,9 kb. Kot preostale člane družine *Coronaviridae* (2) tudi SARS-CoV-2 sestavljajo štiri glavne strukturne beljakovine: glikoprotein (S) oz. bodičasti protein, protein male ovojnice (E), matrični protein (M) in nukleokapsidni protein (N). Proteini S, M in E sestavljajo virusno ovojnico, protein N pa shranjuje virusni genom (4). Preko bodičastega proteina se SARS-CoV-2 veže na receptor encima angiotenzin konvertaza (receptor ACE2), ki ga najdemo na površini številnih človeških celic in je tako odgovoren za vstop virusa v gostiteljsko celico (5). Okužba s SARS-CoV-2 povzroča koronavirusno infekcijsko bolezen 2019 (covid-19). Bolezen se znotraj populacije prenaša izredno hitro. Prenos je najpogosteje povzročen preko respiratornih kapljic, ki nastanejo med govorjenjem, kašljanjem in kihanjem. Inkubacijska doba traja 1–14 dni, običajno se simptomi pojavijo v 3–10 dneh po stiku z okuženo osebo (6). Pri različnih ljudeh se covid-19 kaže z različnimi simptomi. Najpogosteje so ti milejši in med drugim vključujejo vročino, neproduktiven kašelj, težko dihanje, mialgijo (bolečine v mišicah), utrujenost, izgubo voha. V nekaterih primerih se razvijejo resnejši zapleti, kot so citokinske nevihte, akutne respiratorne bolezni, akutne poškodbe ledvičnih tubulov in miokarditis (7, 8). Nekateri bolniki prebolijo okužbo asimptomatsko (9).

Pri zajezitvi razširjanja virusa in pri preprečevanju razvoja hujše oblike bolezni je izrednega pomena zgodnja, natančna in hitra detekcija okužbe. Diagnostični testi, ki določajo trenutno okužbo z novim koronavirusom, temeljijo na detekciji virusne nukleinske kisline ali virusnih proteinov. Identifikacija prebolele okužbe pa temelji na določanju protiteles proti koronavirusu, ki jih detektiramo s serološkimi testi v vzorcu bolnikove krvi (Slika 1) (10, 11). Kot »zlato standard« in referenčna metoda je trenutno v uporabi molekularni diagnostični test, ki zajema reverzno transkripcijo in verižno reakcijo s polimerazo (*reverse transcription polymerase chain reaction*; RT-PCR). Za ugotavljanje prisotnosti virusa v splošni populaciji so na voljo hitri antigeni testi, ki so omogočili testiranje zelo velikega števila ljudi v zelo kratkem času. Poleg omenjenih pa se na področju inovacij dogaja ogromen razvoj drugih metod za detekcijo okužbe s SARS-CoV-2, ki želijo izboljšati diagnostično občutljivost določanja SARS-CoV-2 in

pospešiti sam postopek detekcije. Na Sliki 1 so shematsko prikazane trenutno uporabljane metode in metode v fazi validacije za določanje okužbe s SARS-CoV-2 (10, 11).



Slika 1: Shematski prikaz obstoječih in naprednih metod za detekcijo SARS-CoV-2.

RT-PCR – reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo, RT-LAMP – reverzna transkripcija in z zanko posredovano izotermno pomnoževanje, NGS – sekvenciranje prihodnje generacije, ELISA – encimskoimunski test, CIA – imunokemiluminiscentni test.

V tem prispevku podajamo informacije o trenutno uporabljenih diagnostičnih metodah (samo)testiranja covid-19, kot tudi o prizadevanjih na področju razvoja metod in inovacij, ki detektirajo trenutno ali prebolelo okužbo s SARS-CoV-2. Mnoge od omenjenih metod bi lahko v prihodnosti pomembno prispevale k hitremu določanju okužbe v okviru samotestiranja oziroma testiranja ob preiskovancu (*point-of-care tests*; POCT).

2. DOLOČANJE PROTEINOV SARS-COV-2

Do sedaj poznani testi za določanje proteinov SARS-CoV-2 temeljijo na imunokemijskih reakcijah ali specifičnih interakcijah med makromolekulami in virusnimi proteini (Slika 2). Imunokemijske metode so metode, ki izkoriščajo zelo specifično afiniteto protiteles za tarčni protein (antigen). Z vezavo protiteles na protein (antigen) lahko ta protein detektiramo in v nekaterih primerih tudi kvantitativno določimo v tkivih, celicah ali bioloških vzorcih, zato te metode imenujemo tudi antigeni testi. Biološki vzorec, na katerih izvajajo antigenske teste za prisotnost

SARS-CoV-2, je najpogosteje nosno-žrelni bris. Predvsem v namene samotestiranja se zaradi večje compliance pri bolnikih zadnje čase uporabljata tudi ustno-žrelni bris ali izpljunek po grgranju (10–12).

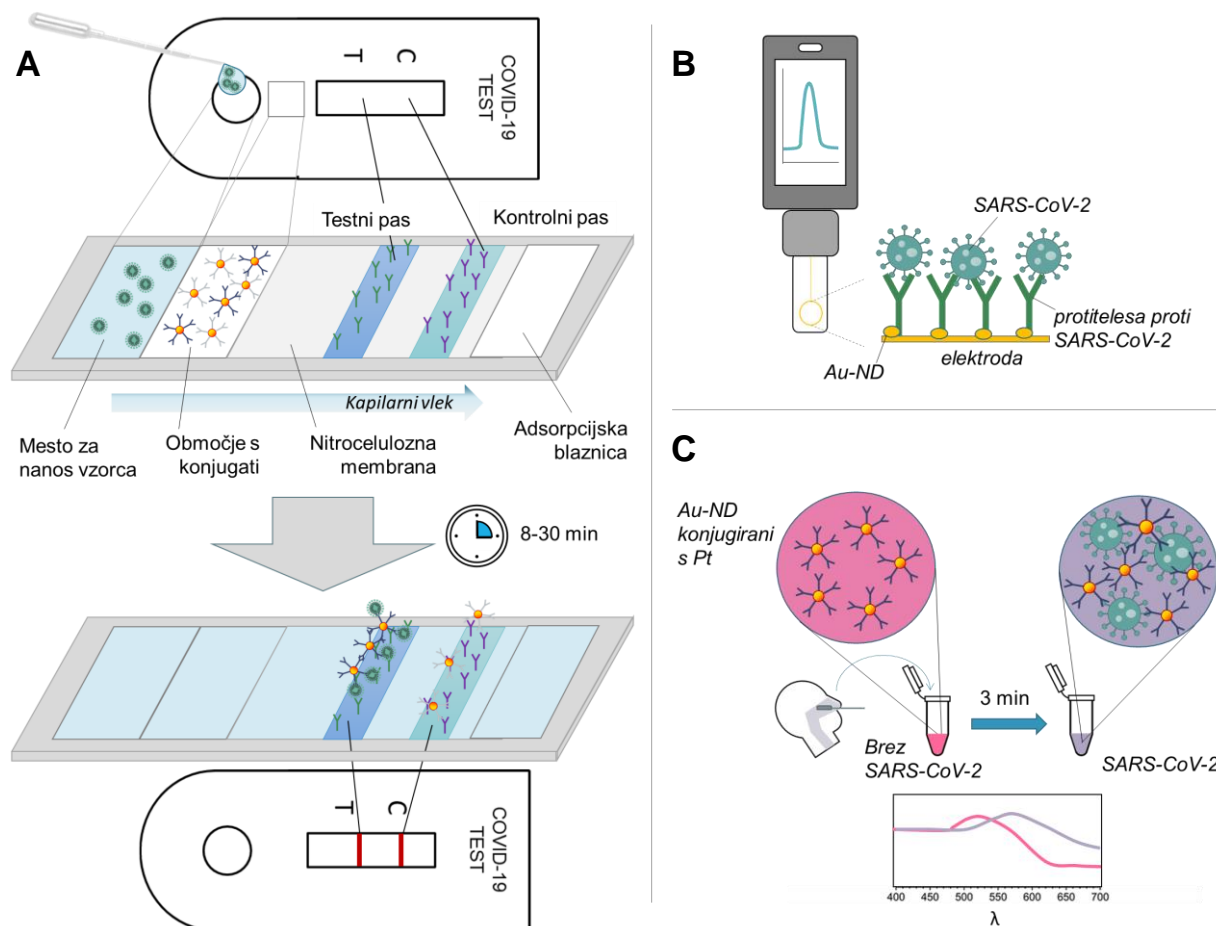
2.1 Hitri antigeni testi za določanje SARS-CoV-2

Hitri antigeni testi (testi HAG) za detekcijo SARS-CoV-2 sodijo med imunokromatografske metode (Slika 2A). Testi delujejo po enakem principu kot npr. testi za samotestiranje nosečnosti. Po odvzemu nosno-žrelnega brisa ali drugega biološkega vzorca bris potopimo in pomešamo v pripravljeni puferski raztopini. Tako pripravljen vzorec nanese na kaseto za določitev SARS-CoV-2 in po 8–30 minutah odčitamo rezultat v obliki obarvanih črtic na testnem okencu.

2.1.1. Princip delovanja hitrih antigenih testov

Hitri antigeni testi delujejo na principu imunokemijske reakcije med protitelesom proti virusnemu antigenu in proteinom na virusni površini ter izkoriščajo lateralno potovanje vzorca po nitrocelulozni membrani. Postopek slikovno opisuje Slika 2A. Membrana se nahaja v kaseti za določitev SARS-CoV-2. Na začetku membrane je blaznica za nanos vzorca, na drugem koncu membrane pa adsorpcijska blazinica, ki omogoča potovanje vzorca. Na sredi membrane sta prečno nanosena dva pasova protiteles. Protitelesa na prvem, testnem pasu so usmerjena proti virusnemu antigenu, največkrat proteinoma N ali S. Na drugi, kontrolni pas so navadno nanosena kontrolna (običajno zajčja) protitelesa, ki so namenjena preverjanju delovanja testa. V neposredni bližini mesta za nanos vzorca in tik pred membrano je rezervoar, ki vsebuje dve vrsti zlatih koloidnih delcev. Na prve delce so konjugirana protitelesa proti virusnemu antigenu, na druge pa protitelesa proti kontrolnemu (npr. zajčjemu) protitelesu. Ob nanosu vzorca na kaseto vzorec v puferski raztopini prepoji blazinico za nanos vzorca in raztopina začne potovati proti adsorpcijski blazinici. Najprej doseže mesto s konjugati (zlatimi koloidnimi delci, vezanimi s protitelesi). V primeru vzorca, ki vsebuje SARS-CoV-2, se bodo v tem delu protitelesa proti virusnemu antigenu na koloidnih delcih vezala in s tem označila virus. Vzorec s protitelesi, vezanimi na SARS-CoV-2, skupaj s preostalimi konjugiranimi protitelesi potuje naprej po nitrocelulozni membrani. Ko doseže pas z nanosenimi protitelesi proti SARS-CoV-2, se na ta pas vežejo virusi, ki so že označeni z zlatimi konjugati. Preostali del vzorca bo potoval naprej. Na pasu, kjer so nanosena kontrolna protitelesa, se bodo ob pravilni izvedbi testa vezala protitelesa proti kontrolnim protitelesom, konjugirana z zlatimi koloidnimi delci. Preostanek vzorca bo potoval naprej do adsorpcijske blazinice. Ob prisotnosti SARS-CoV-2 in pravilni izvedbi testa se bosta oba pasova zaradi vezave konjugatov z zlatimi koloidnimi delci obarvala rdeče, kar bomo opazili kot dve rdeči vodoravni črtici v testnem okencu. Če v vzorcu ni prisotnega SARS-CoV-2, se prva črtica ne bo obarvala rdeče, saj se zlati koloidni delci ne bodo vezali na virusne

antigene in zato ne bodo zastali na prvem pasu protiteles, vezanih na nitrocelulozno membrano. Če test ni bil izveden pravilno oz. je prišlo do napake v proizvodnji same kasete za določanje SARS-CoV-2, na testnem okencu ne bomo opazili kontrolne črtice (13, 14).



Slika 2: Prikaz izbranih metod določanja virusnih proteinov SARS-CoV-2.

A: Hitri antigeni testi. B: Elektrokemijski imunski testi. C: Kolorimetrična metoda z uporabo zlatih nanodelcev. Au-ND – zlati nanodelec, SARS-CoV-2, Υ protitelo proti antigenu SARS-CoV-2, Υ kontrolno protitelo, \star z zlatimi delci konjugirano protitelo proti SARS-CoV-2, \star z zlatimi delci konjugirano protitelo proti kontrolnemu protitelesu.

2.1.2. Značilnosti hitrih antigenih testov

Testi HAG so razmeroma enostavni za uporabo, zato jih uporabljamo kot teste ob preiskovancu. Spadajo v skupino presejalnih testov. Namen presejalnih testov je zgodnje odkrivanje bolezni in hitro ukrepanje, s tem pa tudi zgodnji nadzor nad boleznijo, bodisi na individualnem ali populacijskem nivoju. V primeru testov HAG

za detekcijo SARS-CoV-2 je presejalno testiranje množično, kar pomeni, da želimo z njim presejati velik del populacije in s tem preprečiti hitro širjenje virusa.

S testi HAG za detekcijo SARS-CoV-2 določamo samo prisotnost virusa SARS-CoV-2, ne pa tudi drugih virusov. Govorimo o zelo visoki analitični specifičnosti testa (99,6%), ki zagotavlja, da s testom določamo samo okužbo s SARS-CoV-2, ne pa tudi okužb z virusom gripe, z ostalimi koronavirusi, z virusom MERS-CoV ipd. Ker s testom HAG določamo proteine, le-teh pa ne moremo pomnožiti med samim diagnostičnim postopkom, kot to lahko storimo z nukleinskimi kislinami, imajo ti testi nižjo diagnostično občutljivost kot testi RT-PCR (med 34,1-% in 88,1-%). S testi HAG zaznamo predvsem osebe z visokim virusnim bremenom v nosno-žrelnem predelu; to so predvsem osebe z aktivno okužbo. Te osebe bomo s testi HAG s 95-% zanesljivostjo tudi zaznali. Osebe, ki imajo zelo nizko količino virusa (npr. osebe, ki so covid-19 pravkar prebolele, ali osebe tik pred začetkom pojava simptomov), bomo s testi HAG težje identificirali. Pri teh osebah bo lahko test RT-PCR še vedno pozitiven, test HAG pa bo v približno 50 % primerov pokazal odsotnost virusa. Prav tako je za te teste značilno, da med neokuženimi dajejo več t. i. lažno pozitivnih rezultatov. To je splošna značilnost testov HAG, če z njimi določamo bolezen, ki je v populaciji malo (pod 5 %). Zaradi omenjene značilnosti je ob pozitivnem testu HAG treba okužbo potrditi še s testom RT-PCR (15).

2.2. Biosenzorji - inovativni pristop za zaznavanje SARS-CoV-2

V zadnjem letu so razvili številne metode, ki zaznavajo SARS-CoV-2 na hiter in enostaven način. Večina jih temelji na določanju virusnih proteinov preko vezave s protitelesi ali preko neimunskih interakcij s specifičnimi makromolekulami. K novim metodam detekcije, ki so v razvojnem zamahu tudi na področju diagnostike, sodijo t. i. biosenzorji. Biosenzorji so naprave, s katerimi zaznavamo prisotnost ali koncentracijo biološkega analita. Sestavljeni so iz treh delov: komponente, ki prepozna analit in proizvaja signal, pretvornika signala in bralne naprave. Tovrstne metode predstavljajo velik potencial pri premagovanju pomanjkljivosti starejših metod, kot so testi RT-PCR in računalniška tomografija pljuč, saj omogočajo hitro detekcijo (nekaj minut), nizke stroške, dostopnost širši populaciji, testiranje ob preiskovancu in se ponašajo z visoko analitično občutljivostjo. Poleg tega ima kar nekaj teh metod možnost izvedbe analize s pomočjo pametnih naprav (10-12).

2.2.1. Elektrokemijski imunosenzorji za zaznavanje SARS-CoV-2

Primer so prototipni elektrokemijski imunosenzorji (Slika 2B). Test je sestavljen iz elektronskega nastavka, na katerega je nanosen reagenčni listič. Na koncu lističa je ogljikova elektroda s protitelesi proti proteinu S. Elektronski nastavek povežejo s telefonom, ki ima nameščeno ustrezno aplikacijo. Po odvzemu nosno-žrelnega brisa

le-tega nanesejo direktno na elektrodo. Če pride do interakcij med virusom in protitelesi, se spremeni električni tok med elektrodama, kar se v aplikaciji izriše kot signal. Čas detekcije s tovrstnimi testi se giblje med 10 in 20 minutami. Elektrokemijski imunosenzorji za zdaj še niso odobreni za uporabo. V okviru testiranja enega izmed njih na 300 uporabnikih se je le-ta izkazal za 90-% skladnega s testom RT-PCR. Trenutno poteka študija tega testa na 1.000 uporabnikih (16, 17).

2.2.2. Hitri kolorimetrični test z zlatimi nanodelci

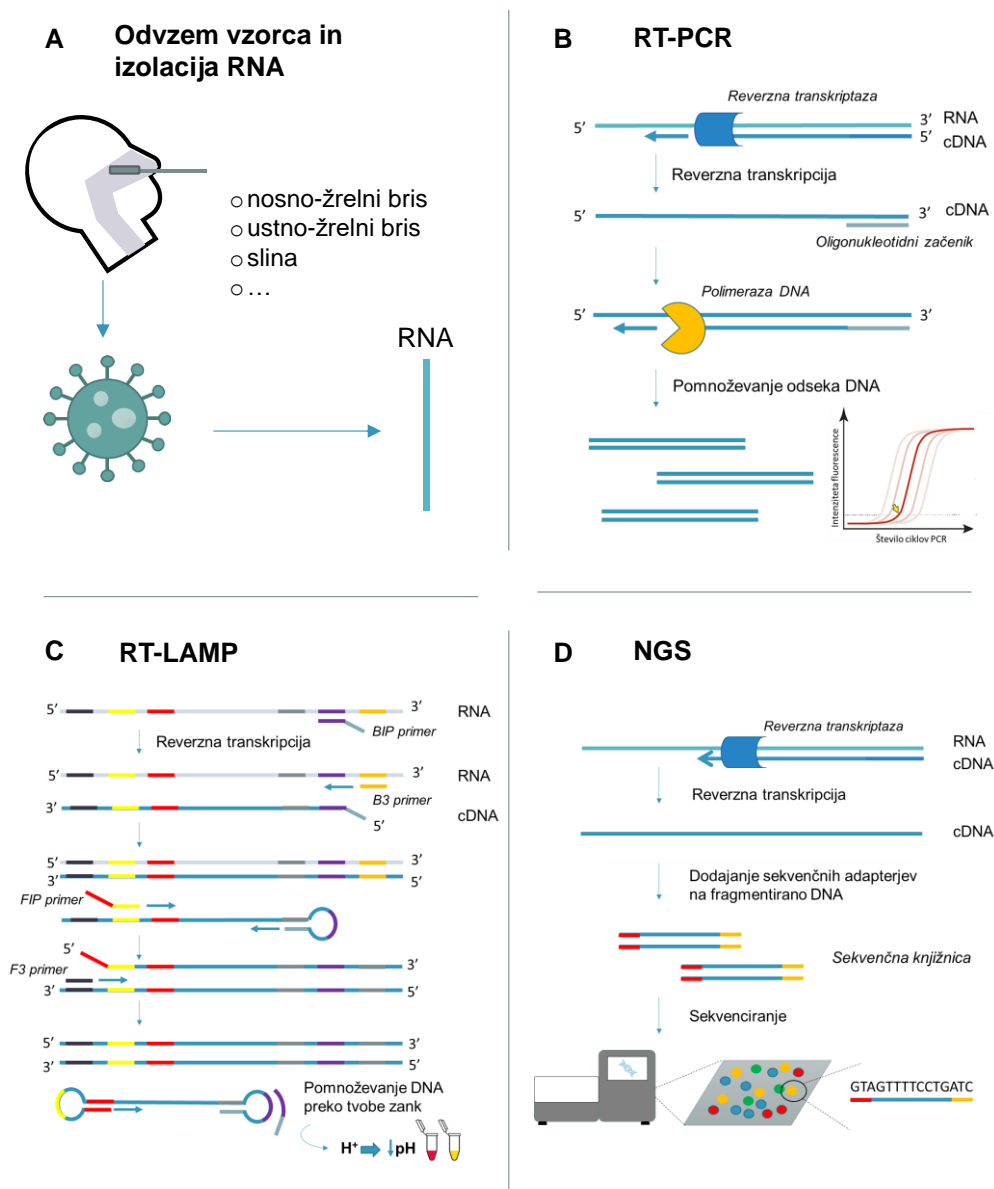
Princip enega od sodobnejših testov temelji na kolorimetrični metodi z zlatimi nanodelci, na katera so vezana protitelesa proti proteinom S, E in M virusa SARS-CoV-2 (Slika 2C). Ta protitelesa so v raztopini, ki ji zlati nanodelci dajejo rdeče/rožnato obarvanje. Ko v to raztopino naneseemo vzorec, ki vsebuje SARS-CoV-2 (nosno-žrelni ali ustno-žrelni bris), se protitelesa vežejo na ustrezne virusne antigene. Nastala interakcija že po 3 minutah sproži premik resonančnega vrha v ekstinkcijskem spektru – raztopina se obarva vijolično. Tako kot testi HAG ima tudi ta metoda slabšo občutljivost. Do spremembe obarvanja ne pride pri nizkih koncentracijah virusa v vzorcu. Podobne vrste kolorimetričnih metod, ki uporabljajo slino kot biološki vzorec in prenosno majhno napravo za določitev ekstinkcijskega koeficienta, so trenutno v fazah kliničnih preizkušanj. Glede na zelo kratek analizni čas bi bili tovrstni testi lahko uporabni pri npr. množičnem testiranju pred prireditvami (18).

2.2.3. Aptasenzorji za zaznavanje SARS-COV-2

Inovacija na področju diagnostičnih testov so tudi aptameri. Aptameri so sestavljeni iz enoverižne nukleinske kisline (RNA ali DNA) ali iz peptida, ki se po specifičnem zvitju v sekundarno strukturo z elektrostatskimi, nekovalentnimi in/ali hidrofobnimi interakcijami vežejo na točno določeno mesto na tarčni molekuli. Njihova specifičnost je podobna specifičnosti protiteles. Za namen detekcije SARS-CoV-2 je bilo do danes razvitih kar nekaj aptamerov. Nekateri so usmerjeni proti proteinu S, drugi detektirajo protein N. Na koncu aptamera je vezano bodisi fluorescentno barvilo bodisi zlati nanodelci, lahko pa je nanje konjugirano tudi protitelo za merjenje kemiluminiscence ali kak drug optični ali električni biosenzor. Tovrstni aptameri so zato dobili ime aptasenzorji. Aptasenzorji za zaznavanje SARS-CoV-2 so lahko nanoseni na membrane, lističe ali čipe. Le-te izpostavimo biološkemu vzorcu. Ob vezavi aptamera na protein virusa SARS-CoV-2 se aptasenzorju spremenijo fluorescentne lastnosti, površinska plazmonska resonanca oz. druge spektrofotometrične ali elektrokemijske lastnosti. Po 10 minutah navadno z manjšo napravo detektiramo signal. Tovrstni testi imajo visoko analitsko občutljivost in specifičnost za SARS-CoV-2. Trenutno so številni aptasenzorji v fazah razvoja ali v fazi preizkušanj na večjem številu bioloških vzorcev, zato zanesljivih podatkov o točnosti testov v primerjavi s testom RT-PCR še ni (11, 16, 19).

3. DOLOČANJE NUKLEINSKE KISLINE SARS-COV-2

Preverjanje prisotnosti določenega genskega materiala v biološkem vzorcu preverjamo z molekularnimi testi. Do danes je bilo razvitih več sto različnih testov za določanje SARS-CoV-2, ki temeljijo na detekciji njegove nukleinske kisline. Med njimi so test RT-PCR, izotermno pomnoževanje in metode sekvenciranja prihodnje generacije (10–12). Pri vseh omenjenih metodah je v največ primerih po odvzemu vzorca potrebna tudi izolacija RNA (Slika 3A).



Slika 3: Prikaz poglavitnih metod za detekcijo RNA iz SARS-CoV-2.

A: Odvzemu vzorca sledi izolacija RNA. B: Reverzna transkripcija sklopljena z verižno reakcijo s polimerazo. C: Z zanko posredovano izotermno pomnoževanje DNA. D: Sekvenciranje prihodnje generacije.

3.1. Test RT-PCR

Med testi, ki določajo nukleinske kisline, se pri zaznavanju SARS-CoV-2 kot »zlati standard« uporabljata test RT-PCR (Slika 3B). Pri tovrstnem testu odvzemu vzorca sledi liza virusa in izolacija RNA. Da verižna reakcija s polimerazo lahko poteče, encim reverzna transkriptaza najprej prepíše RNA v komplementarno verigo DNA (cDNA). Sledi pomnoževanje specifičnega tarčnega odseka virusne cDNA, za kar potrebujemo encim polimerazo DNA, ustrezno reakcijsko mešanico, ustrezne termične pogoje, ki omogočajo spreminjanje temperature tekom reakcije, ter ustrezne začetne oligonukleotide (*ang. primers*), ki se vežejo na točno določeno zaporedje v tarčnem odseku. Običajno z uporabo RT-PCR zaznavamo odseke na genu za protein E, na genu za protein N ali na genu v območju odprtega bralnega okvirja (*ang. open reading frame; ORF*) SARS-CoV-2. Za vsak vzorec se vedno preveri prisotnost dveh različnih odsekov na genih SARS-CoV-2. Poleg dveh od omenjenih genov se vedno izvede še detekcija človeške mRNA, običajno *RNaze P*, ki služi kot kontrola, da je v reakciji res prisoten človeški vzorec in da je bila izolacija RNA uspešna. Trenutno sta na trgu na voljo dve obliki testa RT-PCR: t. i. »singleplex« in »multiplex«. Pri prvem se v vsaki reakcijski mešanici preverja samo en gen, pri drugi pa se z uporabo specifičnih fluorescenčnih sond lahko izvede določanje tudi do treh genov hkrati. S testi RT-PCR lahko zaznamo okužbo s SARS-CoV-2 1–2 dneva pred pojavom simptomov ter 2–3 tedne po okužbi. Osnovni koraki za nastavitev reakcije RT-PCR so preprosti, vendar za to potrebujemo ustrezno usposobljeno osebje in laboratorij. Druge večje pomanjkljivosti testa RT-PCR pri testiranju covid-19 vključujejo še relativno drage reagente za izvedbo testiranja in čas, ki je potreben za dokončanje testa. V zadnjem času si prizadevajo skrajšati čas analize predvsem s hitrejšo izolacijo RNA in z uporabo »multiplex« metod. Stroške analize želijo znižati predvsem z združevanjem vzorcev (11).

3.2. Testi izotermne amplifikacije (RT-LAMP)

Da bi prešli nekatere omejitve testa RT-PCR, so razvili metodo reverzne transkripcije, sklopljene z zanko posredovanim izotermnim pomnoževanjem (Slika 3C; *ang. reverse transcription and loop-mediated isothermal amplification; RT-LAMP*). Tudi tu uporabimo specifične začetne oligonukleotide, ki se prilegajo določenemu odseku enega od genov v genomu SARS-CoV-2 (genu za protein E, N ali proteine v ORF). V reakcijski mešanici so še reverzna transkriptaza, polimeraza DNA in barvni indikator, ki spremeni obarvanje pri prehodu v kisli pH. Po izolaciji RNA se le-to prenese v reakcijsko mešanico in se tako pripravljen vzorec inkubira pol do eno uro na 65 °C. V tem času poteče prepis iz RNA v cDNA ter pomnoževanje DNA. Zaradi pomnoževanja DNA se pH reakcijske mešanice zniža, kar privede do spremembe obarvanja barvnega indikatorja; pri fenol rdečem je to npr. iz rdeče v rumeno. Ta sprememba je vidna s prostim očesom in za razliko od testa RT-PCR za njeno detekcijo ne potrebujemo

posebne naprave. RT-LAMP bi bil lahko test za uporabo ob bolniku, saj za njegovo izvedbo potrebujemo samo termostat, ki se lahko segreje do 65 °C (20).

Test RT-LAMP ima visoko specifičnost za SARS-CoV-2 in je lahko stroškovno učinkovitejši. Na osnovi metodologije LAMP so razvili avtomatizirane naprave, ki jih sicer že uporabljajo za detekcijo virusa HIV v državah tretjega sveta. Sedaj so omenjene naprave prilagodili tudi na zaznavanje virusa SARS-CoV-2, kar bi lahko pomembno prispevalo k diagnostiki covid-19 v manj razvitih državah (21). Pomanjkljivosti testa RT-LAMP so nezmožnost izvedbe velike količine testov naenkrat in občutljivost na pH. Slednje je še posebej pomembno pri vzorcih sline, ki so že navadno bolj kisli. Uporaba sline kot biološkega vzorca pri tem testu bi tako lahko privedla do velike količine lažno pozitivnih rezultatov. Po novejših študijah ima metoda RT-LAMP za določanje SARS-CoV-2 96,88-% občutljivost pri nosno-žrelnih brisih, 94,04-% v vzorcih sline in 93,33-% občutljivost pri vzorcih ustno-žrelnega brisa (20).

3.3. Sekvenciranje prihodnje generacije

Sekvenciranje prihodnje generacije (*ang. next generation sequencing*; NGS) je tehnologija, ki omogoča hkratno določanje tisoče fragmentov DNA in lahko identificira genski material iz različnih vrst organizmov. Pri covid-19 je metodologija NGS omogočila identifikacijo novega virusa – SARS-CoV-2, uporablja se za diagnostiko covid-19, omogoča sledenje izbruhom te bolezni in nadzor okužbe, v zadnjem času pa se omenja predvsem pri odkrivanju mutacij in novih različic SARS-CoV-2. Ker sama metodologija zahteva zelo specifično opremo in vrhunsko usposobljeno osebje, obdelava vzorca in detekcija pa nista hitri, NGS ne moremo vključiti med metode testiranja ob preiskovancu (11).

4. SEROLOŠKI TESTI ZA DOLOČANJE PREBOLELE OKUŽBE S SARS-COV-2

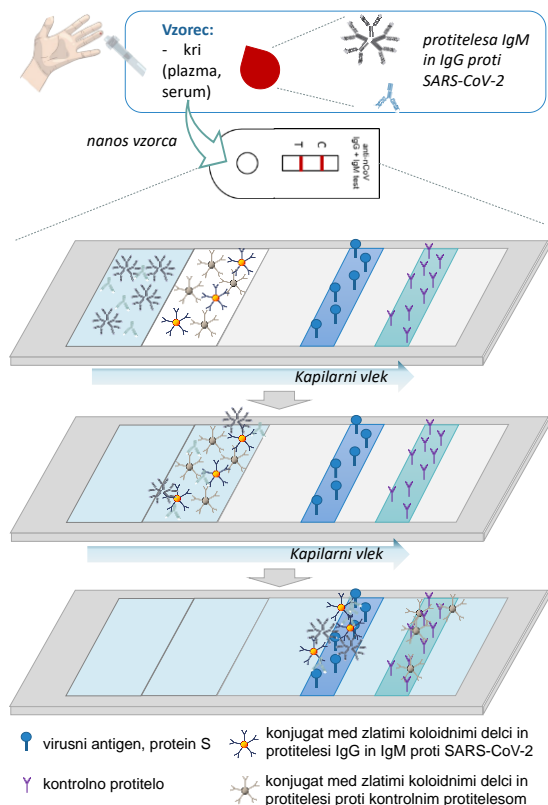
Serološki testi preverjajo prisotnost protiteles proti SARS-CoV-2 v krvnem vzorcu. Po okužbi začno bolnikovi limfociti B proizvajati protitelesa, usmerjena proti virusnim antigenom. Dinamika prisotnosti in količine protiteles v krvi bolnika je odvisna od tipa protitelesa. Protitelesa IgM so zgodnja in začnejo nastajati kmalu po nastopu simptomov, a so v krvi prisotna le še mesec po okužbi. Protitelesa IgG imajo večjo afiniteto do virusnih antigenov, v krvi bolnika jih zaznamo okoli 7 dni po okužbi, a tam vztrajajo predvidoma še nekaj mesecev po preboleli okužbi. V času okužbe naj bi nastajala tudi protitelesa IgA, katerih dinamika nastajanja je manj jasna. Protitelesa IgA naj bi imela pomembno vlogo predvsem pri nevtralizaciji virusa v bolnikovih sluznicah (v respiratornih in prebavnih poteh) (22).

Serološki testi pokažejo, ali je oseba okužbo s SARS-CoV-2 že prebolela in razvila imunost. Testi niso učinkoviti za dokazovanje bolezni covid-19, saj običajno telo v zgodnjih fazah okužbe še ne razvije ustreznega specifičnega imunskega odgovora. Serološki testi lahko pokažejo prisotnost IgG, IgM ali obeh vrst protiteles. Običajno imajo visoko diagnostično specifičnost (med 98-% in 100-%) in diagnostično občutljivost (med 91,8-% in 94,1-%) (23, 24). Namen tovrstnih testov je predvsem spremljanje prebolelih okužb v splošni populaciji. Pomembni so tudi v raziskovalne namene pri razjasnjevanju odgovora posameznika na okužbo s SARS-CoV-2. Z njimi lahko prepoznamo tudi posameznike, ki bi lahko darovali plazmo v raziskovalne namene.

Vsi serološki testi izkoriščajo vezavo protiteles na rekombinantni virusni antigen. Razvoj teh testov je nekoliko zahtevnejši od antigenih testov, saj je potrebno natančno poznavanje zgradbe virusnih antigenov. Nekatere serološke teste lahko izvedemo le v laboratorijskem okolju (npr. ELISA ali CIA), medtem ko imunokromatografski testi predstavljajo pomemben korak pri razvoju hitrih testov detekcije okužbe s SARS-CoV-2 za domačo uporabo (11).

4.1. Hitri serološki testi

Hitri serološki testi tako kot testi HAG temeljijo na imunokromatografski metodi z lateralnim tokom.



Slika 4: Shematski prikaz poteka hitrega serološkega testa.

Kot prikazuje Slika 4, imamo pri hitrih seroloških testih na nitrocelulozni membrani pas z vezanim virusnim antigenom in pas, na katerem je vezno kontrolno protitelo. Tik za mestom nanosa vzorca imamo rezervoar s konjugiranimi protitelesi. Na zlate koloidne delce so nanosena protitelesa, usmerjena proti virusnim protitelesom, ki so v bolnikovi krvi. V tem delu imamo tudi konjugate s protitelesi proti kontrolnim protitelesom na membrani. Običajno si lahko s pomočjo lancete preiskovanec sam odvzame kri, ki jo nanese na mesto za nanos vzorca. Vzorec bo potoval proti membrani, konjugati se bodo vezali na protitelesa proti SARS-CoV-2 in skupaj potovali do pasu, kjer je nanosen virusni antigen. Nanj se bodo vezala protitelesa proti SARS-CoV-2, ki so označena s konjugati. Do naslednjega pasu bodo nato potovali še konjugati s protitelesi proti kontrolnim protitelesom. Če imamo protitelesa prisotna in je bil test pravilno izveden, bomo na testnem okencu opazili dve prečni rdeče obarvani črtici. Hitri serološki testi rezultat običajno podajo v 20–30 minutah. Omogočajo detekcijo IgG, IgM ali obeh vrst protiteles (25).

5. POMEN BIOLOŠKEGA VZORCA

Čeprav je sam postopek hitrih diagnostičnih testov enostaven, je za doseganje največje možne zanesljivosti testa pomembno, da je vzorec odvzet pravilno. To pomeni, da vzorec odvzame za to usposobljeno osebo oz. da je odvzem vzorca nadzorovan. Kot biološki vzorec izbora se v diagnostiki SARS-CoV-2 uporablja nosno-žrelni bris, saj vsebuje visoko koncentracijo virusnih delcev. Med pomembne biološke vzorce z visoko koncentracijo virusa šteje tudi slina, a je pri preprečevanju lažno negativnih rezultatov zelo pomemben njen odvzem – brez predhodnega zaužitja hrane, globok žrelni pljunek. Biološki vzorci, ki še vsebujejo virus, so ustno-žrelni bris, izpljunek po grgranju, grleni ali bronhoalveolarni izpirek ter feces. Kri vsebuje zelo nizke količine virusa in se kot biološki vzorec uporablja za detekcijo prebolele okužbe (20, 26).

Ker ima nosno-žrelni predel visoko virusno breme, je nosno-žrelni bris zajet in validiran biološki vzorec v največ kliničnih študijah. Pri odvzemu je pomembno, da z brisom posežemo dovolj globoko in da zanesljivo postrgamo nosno-žrelno sluznico, to pa lahko izvede le za to usposobljeno osebo. V primeru samotestiranja bi se lahko zgodilo, da preiskovanec ne bi posegel dovolj globoko skozi nosno votlino, kar bi lahko privedlo do napačne interpretacije rezultata. Nekateri države to rešujejo s tem, da se preiskovanci ob samoodvzemu nosno-žrelnega brisa posamejno in posnetek pošljejo strokovnemu osebju, ki nato oceni pravilnost izvedbe odvzema in smiselnost končnega rezultata (27, 28).

6. ZAKLJUČEK

Hipen razvoj molekularno bioloških tehnik ob začetku pandemije je napovedal izredno zanimivo dogajanje na področju razvoja laboratorijske diagnostike. Zaradi izbruha covid-19 so v zadnjem letu razvoj in raziskave potekali hitreje kot kdaj koli prej na področju diagnoze bolezni. Države se še vedno trudijo pospešiti testiranje zaradi dolgotrajnega in dragega testa RT-PCR, ki pogosto zahteva centralizirane storitve. V tej pandemiji je zato izjemnega pomena razvoj in vzpostavitev inovativnega diagnostičnega orodja, ki bi bilo enostavno za uporabo, natančno, občutljivo in dostopno širši populaciji. Imunokromatografski testi z lateralnim tokom imajo prednosti pred RT-PCR v državah v razvoju in za presejalno testiranje. Kljub njihovi visoki uporabni vrednosti imunokromatografski testi ne dajejo izrecne slike resnosti bolezni, treba pa je upoštevati tudi njihovo značilnost, tj. več lažno pozitivnih rezultatov.

Zahteva po hitrem diagnostičnem orodju, ki bi ga bilo možno množično uporabljati, je zato zelo velika. Tehnologija na osnovi biosenzorjev, ki lahko v nekaj sekundah zagotovijo diagnozo covid-19, bi v prihodnosti to zahtevo lahko izpolnila. Obstaja veliko metodologij in naprav, namenjenih hitri diagnozi covid-19, ki so v različnih fazah validacije za prenos na trg. Razvoj tovrstnih hitrih in zanesljivih orodij bo pomagal pri določitvi okužbe takoj ob pojavu simptomov, omogočil bo prepoznati asimptomatske bolnike in se izogniti nepotrebni karanteni, ki je negativno vplivala na družbeno življenje zadnjega leta in povzročila resno socialnogospodarsko krizo.

LITERATURA

1. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV): situation report, 10 (Report). 2020 Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330775/nCoVsitrep30Jan2020-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [cited 2021 May 6].
2. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Vol. 5, Nature Microbiology. Nature Research; 2020. p. 536–44.
3. COVID Live Update-available from: <https://www.worldometers.info/coronavirus>. Dostop: 6.5.2021
4. Wu C, Liu Y, Yang Y, et al. Analysis of therapeutic targets for SARS CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. Acta Pharm Sin B. 2020 May 1;10(5):766–88.
5. Xu X, Chen P, Wang J, al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. Vol. 63, Science China Life Sciences. Science in China Press; 2020. p. 457–60.
6. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. Vol. 19, Nature Reviews Microbiology. Nature Research; 2021. p. 141–54.
7. Li J, Huang DQ, Zou B, et al. Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. J Med Virol. 2021 Mar 1;93(3):1449–58.
8. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel

- coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395(10223):507–13.
9. Sayampanathan AA, Heng CS, Pin PH, Pang J, Leong TY, Lee VJ. Infectivity of asymptomatic versus symptomatic COVID-19. Vol. 397, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2021. p. 93–4.
 10. Sheikhzadeh E, Eissa S, Ismail A, Zourob M. Diagnostic techniques for COVID-19 and new developments. Vol. 220, *Talanta*. Elsevier B.V.; 2020. p. 121392.
 11. Verma N, Patel D, Pandya A. Emerging diagnostic tools for detection of COVID-19 and perspective. *Biomed Microdevices*. 2020 Dec 1;22(4):1–18.
 12. Xu M, Wang D, Wang H, Zhang X, Liang T, Dai J, et al. COVID-19 diagnostic testing: Technology perspective. *Clin Transl Med*. 2020 Aug 1;10(4):e158.
 13. Rapid evaluation of Lateral Flow Viral Antigen detection devices (LFDs) for mass community testing. Available from: <https://www.gov.uk/government/publications/assessment-and-procurement-of-coronavirus-covid-19-> [cited 2021 May 6]
 14. COVID-19 Antigen Rapid Test | Prima Home Test [Internet]. [cited 2021 May 6]. Available from: https://primahometest.com/en/covid-19_antigen_rapid_test
 15. Dinnes J, Deeks JJ, Berhane S, Taylor M, Adriano A, Davenport C, et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. Vol. 2021, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2021.
 16. Orooji Y, Sohrabi H, Hemmat N, Oroojalian F, Baradaran B, Mokhtarzadeh A, et al. An Overview on SARS-CoV-2 (COVID-19) and Other Human Coronaviruses and Their Detection Capability via Amplification Assay, Chemical Sensing, Biosensing, Immunosensing, and Clinical Assays. Vol. 13, *Nano-Micro Letters*. Springer Science and Business Media B.V.; 2021.
 17. French researchers trial more accurate fast COVID-19 test [cited 2021 May 6]. Available from: <https://www.reuters.com/article/us-health-coronavirus-france-covid-test-idUKKBN2AN0U2>
 18. Ventura B Della, Cennamo M, Minopoli A, Campanile R, Censi SB, et al. Colorimetric test for fast detection of SARS-COV-2 in nasal and throat swabs. *ACS Sensors*. 2020 Oct 23;5(10):3043–8.
 19. Applications of aptamers in detection and therapeutics of SARS-CoV. [cited 2021 May 6]. Available: <https://aptamergroup.com/applications-of-aptamers-in-detection-and-therapeutics-of-sars-cov/>
 20. Chow FWN, Chan TTY, Tam AR, Zhao S, Yao W, Fung J, et al. A rapid, simple, inexpensive, and mobile colorimetric assay covid-19-lamp for mass on-site screening of covid-19. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 1;21(15):1–10.
 21. Assennato SM, Ritchie A V., Nadala C, et al. Performance evaluation of the SAMBA II SARS-CoV-2 test for point-of-care detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol*. 2021 Jan 1;59(1).
 22. Post N, Eddy D, Huntley C, van Schalkwyk MCI, Shrotri M, Leeman D, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS One*. 2020 Dec 1;15(12):e0244126.
 23. Andrey DO, Cohen P, Meyer B, et al. Head-to-Head Accuracy Comparison of Three Commercial COVID-19 IgM/IgG Serology Rapid Tests. *J Clin Med*. 2020 Jul 24;9(8):2369.
 24. Bisoffi Z, Pomari E, Deiana M, et al. Sensitivity, specificity and predictive values of molecular and serological tests for COVID-19: A longitudinal study in ER. *Diagnostics*. 2020 Sep 1; 10(9).
 25. Li Z, Yi Y, Luo X, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol*. 2020 Sep 1;92(9):1518–24.
 26. Trypsteen W, Van Cleemput J, van Snippenberg W, Gerlo S, Vandekerckhove L. On the whereabouts of SARS-CoV-2 in the human body: A systematic review. *PLoS Pathog*. 2020 Oct 30;16(10):e1009037.
 27. Kinloch NN, Ritchie G, Brumme CJ, Dong W, Dong W, Lawson T, et al. Suboptimal biological sampling as a probable cause of false-negative COVID-19 diagnostic test results. *J Infect Dis*. 2020 Sep 15;222(6):899–902.
 28. Wu J, Liu J, Li S, et al. Detection and analysis of nucleic acid in various biological samples of COVID-19 patients. Vol. 37, *Travel Medicine and Infectious Disease*. Elsevier Inc.; 2020. p. 101673.

TESTIRANJE COVID-19: ZMOTE IN RESNICE

asist. dr. Matjaž Ravnikar, mag. farm

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo

POVZETEK

V pričujočem članku smo se posvetili najpogostejšim zmotam v zvezi z virusom covid-19, ki se širijo med laično javnostjo, najpogosteje na družbenih omrežjih. V upanju, da bomo s tem lahko prispevali k boljšemu razumevanju virusa, testiranj in splošne zdravstvene situacije v času epidemije, smo ovrgli najbolj razširjene in škodljive teorije, ki jih znanost ne podpira. Med drugim smo tako pojasnili, zakaj je testiranje s pomočjo verižne reakcije s polimerazo v realnem času primerno za preverjanje okužbe s covid-19, zakaj večje število testov ne pomeni avtomatično večjega števila okuženih, kdaj lahko ob negativnem testu prekinemo karanteno, zakaj odvzem brisa iz nosne votline ne more poškodovati krvno-možganske pregrade in še nekaj drugih aktualnih vprašanj.

1. UVOD

V preteklem letu se je tako v nekaterih medijih kot tudi na družbenih omrežjih pojavilo veliko število polresnic, zavajanj, zmot in »teorij zarot«, povezanih z virusom SARS-CoV-2. Kljub temu da je prispevek pripravljen za strokovno javnost, ki je usposobljena za kritično presojo informacij z zdravstvenega področja, je tukaj zbranih in obravnavanih nekaj tem, ki so se najpogosteje pojavljale v zvezi s testi in testiranji omenjenega virusa. Nekatere, morda že na prvi pogled očitne zmote, so si kljub vsemu utrle prostor med številne ljudi in mednje zasejale strah, nezaupanje in dvome v znanost in stroko. Zato je prav, da jih v tem prispevku vzamemo pod drobnogled.

2. DOKAZOVANJE MIKROORGANIZOMOV Z METODO PCR

“Izumitelj verižne reakcije s polimerazo (PCR) Kary Mullis je trdil, da ta metoda ni primerna metoda za dokazovanje mikroorganizmov.”

Ameriški biokemik Kary Mullis, ki je leta 1983 odkril metodo PCR (verižna reakcija s polimerazo) in zanjo deset let kasneje dobil Nobelovo nagrado (1), naj bi izjavil, da se z metodo PCR ne da odkrivati infektivnih virusov. Ta izjava naj bi nakazovala, da metode, ki temeljijo na omenjeni reakciji, niso primerne za testiranje covid-19.

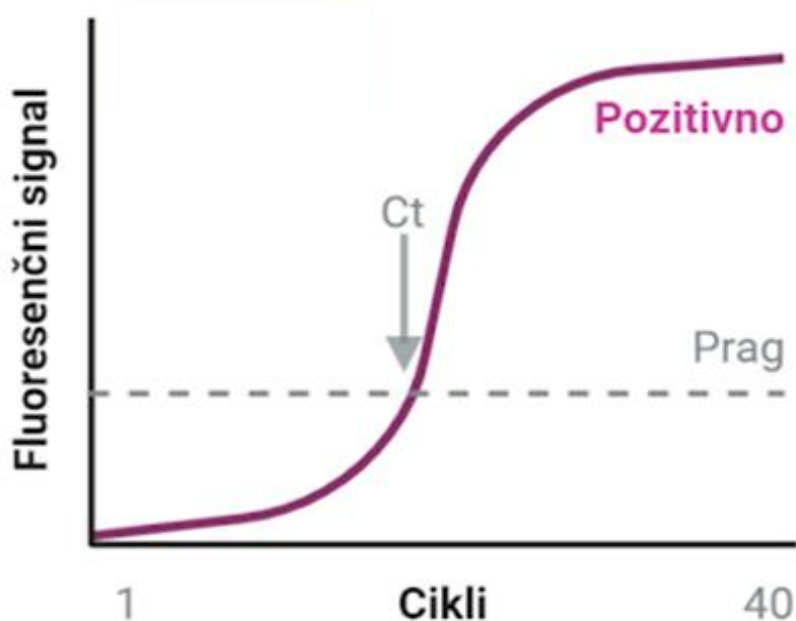
Izjavo je napisal John Lauritsen (in jo pripisal Mullisu) leta 1996 in se je nanašala na virus HIV (2). Avtor razlaga, da je metoda PCR kvalitativna, in ne kvantitativna (takrat qPCR še ni bil na voljo v analitiki), ter da z metodo ne dokazujemo celih virusov, ampak le njihov genski material. Tudi če bi Kary Mullis izjavil kaj podobnega, to ne bi pomenilo, da test PCR ni primeren za diagnostiko virusa covid-19, ampak da zgolj na podlagi testa PCR (ki zazna prisotnost genetskega materiala virusa) ne moremo sklepati, ali je pozitiven preiskovanec kužen ali ne. S tem testom potrdimo samo prisotnost virusnega dednega materiala.

3. OBČUTLJIVOST, SPECIFIČNOST TER MANIPULACIJA TESTOV PCR

“Test PCR pogosto daje lažno pozitiven rezultat oziroma se ga da prirejati s številom ciklov/mejo detekcije.”

Če je v vzorcu, ki ga pomnožujemo s qPCR, iskano gensko zaporedje, se bo le-to v vsakem od ciklov podvojevanja pomnožilo. Meja detekcije je mejna vrednost signala, ki presega šum (nespecifično vrednost fluorescenčnega signala). Vrednost Ct je zaporedna številka cikla, v katerem je signal presegel prag (mejo detekcije) (Slika 1).

Nižja kot je ta vrednost, več je bilo iskanega zaporedja v vzorcu. Vsaka metoda qPCR je validirana in ima specifično mejno vrednost meje detekcije in mejno vrednost Ct, pri kateri potrdimo prisotnost iskanega genskega zaporedja v vzorcu. Pri nobeni od objavljenih študij, kjer so testirali vzorce dihal izpred epidemije s qPCR, niso zaznali prisotnosti virusa covid-19 (3). Nobeden od vzorcev ni bil pozitiven, kar je še dodatna potrditev selektivnosti testa.

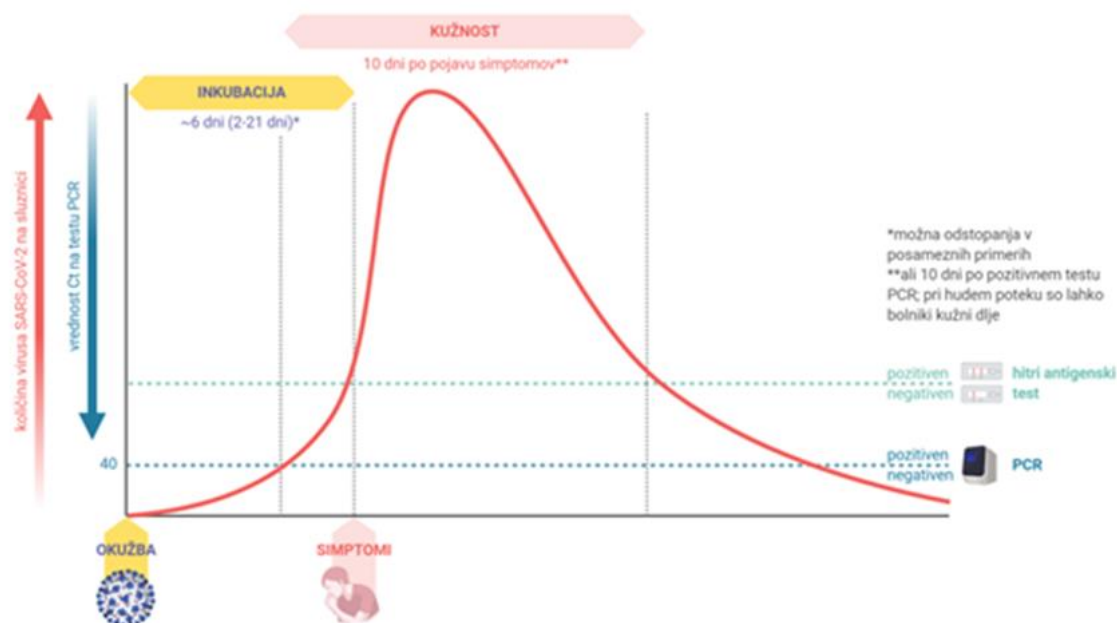


Slika 1: Prikaz signala, ki je posledica pomnoževanja iskanega zaporedja pri qPCR (Vir: covid-19.sledilnik.org).

4. POMEN NEGATIVNEGA REZULTATA TESTA PCR

“Negativen test PCR vedno pomeni odsotnost virusa.”

Negativen test ne pomeni nujno odsotnosti virusa. Obstaja možnost, da je virus na mestu brisa prisoten v koncentraciji, ki je pod mejo detekcije metode. Taka situacija je pogosta predvsem v prvih dneh po okužbi, ko je količina virusa še razmeroma majhna (Slika 2).



Slika 2: Pozitivnost diagnostičnih testov med okužbo s SARS-CoV-2 (Vir: covid-19.sledilnik.org).

5. DELEŽ POZITIVNIH VZORCEV

“S povečevanjem števila testiranih se umetno povečuje število pozitivnih primerov.”

Z večanjem števila testov seveda lahko odkrijemo več okuženih. Do pomembnih odstopanj v številu pozitivnih primerov lahko pride, če se opravi bistveno premalo testov. Pri tem je zelo pomemben delež pozitivnih vzorcev. Če je ta zelo visok, pomeni, da se virus v populaciji hitro širi oz. da je bilo opravljenih premalo testov in smo veliko pozitivnih pacientov »spregledali« (4). Če je delež pozitivnih vzorcev zelo nizek, se virus v populaciji širi počasi oz. obstaja možnost, da bi lahko zmanjšali število testov.

6. NEGATIVEN TEST IN PREKINITEV KARANTENE

“V primeru negativnega testa covid-19 lahko predčasno prekinem karanteno.”

To drži – pod pogojem, da imamo negativen test na covid-19, lahko karanteno predčasno prekinemo. Na podlagi lokalne razpoložljivosti virusnega testiranja se lahko za ljudi brez simptomov karantena konča:

- 7. dan po prejemu negativnega rezultata testa (PCR ali antigeneskega),
- 10. dan brez testiranja.

Po zaključku karantene morate še vedno spremljati vse simptome in se takoj izolirati in obrniti na svojega osebnega zdravnika, če se pojavijo simptomi. Če ste bili pred več kot dvema tednoma cepljeni (z zadnjim odmerkom), vam ni treba v karanteno po izpostavljenosti SARS-CoV-2, če nimate simptomov covid-19. Če pa imate simptome in je preteklo manj kot 14 dni, odkar ste bili cepljeni, morate v karanteno (ki jo lahko po 7 dneh prekinete z negativnim testom) (5).

7. VPLIV BRISA NA KRVNO-MOŽGANSKA BARIERO

“Odvzem vzorca za test lahko poškoduje krvno-možgansko pregrado.”

Na družbenih omrežjih so se pojavile trditve, da lahko pri brisu globoko v nosno votlini (bris nosno-žrelnega prostora) pride do poškodb krvno-možganske bariere, kar lahko povzroči infekcijo. Ta naj bi bila še posebej verjetna zaradi mikroorganizmov, ki se zadržujejo v zaščitnih maskah.

V resnici je anatomsko nemogoče, da bi skozi nosno votlino dosegli krvno-možgansko pregrado (Slika 3), saj možgane od nosne votline ločuje koščena plast, imenovana kribrififormna plošča (6).



Slika 3: Prikaz izvedbe brisa v nosno-žrelni votlini (Vir: Health Education Materials, Kanada).

8. LOKALNA OBČUTLJIVOST PRI ODVZEMU BRISA

“Bris nosno-žrelnega prostora lahko povzroči vnetje sluznice.”

Velika večina ljudi prenese brise nosno-žrelnega prostora, tudi redno ponavljajoče, brez kakršnih koli težav, nekaj odstotkov preiskovancev pa lahko izkusi draženje, boleč občutek ali rahlo krvavitve iz nosu (7). Razlike pri občutljivosti na bris so posledica več faktorjev:

- **Anatomija nosu:** Oblika nosnih poti se med ljudmi razlikuje, mnogi imajo večjo ali manjšo ukrivljenost septuma. Na občutljivost vpliva tudi prisotnost nosnih polipov, postoperativnih brazgotin ali posledic poškodb nosu. Prav tako se med ljudmi razlikuje stopnja oživčenosti nosno-žrelne sluznice.
- **Stanje sluznice:** Vneta in razdražena sluznica (npr. pri prehladu ali pri senenem nahodu) je mnogo občutljivejša pri jemanju brisa od zdrave. Prav tako so v teh primerih nosne poti zožane zaradi zatekanja sluznice, kar še dodatno povzroča neugodje pri jemanju vzorca. Na krvavitve sluznice lahko vpliva tudi antikoagulantna terapija (8).
- **Izvedba brisa:** Na izkušnjo preiskovanca lahko v veliki meri vpliva usposobljenost osebja, ki jemlje bris. Ta je veliko manj neprijeten, če je opravljen na pravilen način. Tako je lahko npr. samotestiranje pri nevešči osebi mnogo neprijetnejše od brisa, ki ga opravi usposobljeno osebje.

9. ZANESLJIVOST HITRIH ANTIGENSKIH TESTOV

“Hitri testi so nezanesljivi.”

Zaradi množice proizvajalcev in ponudnikov hitrih testov je težko podati enoznačno oceno. Hitri testi morajo imeti po kriterijih Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) vsaj 80-% občutljivost in vsaj 97-% selektivnost. Ena izmed zadnjih večjih objavljenih študij na več kot 1.000 preiskovancih je primerjala občutljivost in selektivnost dveh hitrih testov glede na test qPCR. Rezultati so pokazali 85,5-% občutljivost in 100-% selektivnost za en hitri test ter 89-% občutljivost in 99,7-% selektivnost za drugega. Pri simptomatskih preiskovancih je bila občutljivost še višja; povprečna občutljivost obeh testov je znašala 95 %. Čeprav je zanesljivost hitrih testov nekoliko nižja od metode qPCR, ta razlika ni zelo velika (9). Tako je uporaba hitrih testov zaradi njihove cenovne dostopnosti, enostavnosti izvedbe in hitrosti smiselna za množično testiranje. Kot zanimivost naj navedemo, da so hitri testi na covid-19 v povprečju zanesljivejši od npr. testov nosečnosti, ki jih ženske opravijo doma (10), imajo pa tudi slednji zelo visoko

stopnjo zanesljivosti, če so opravljeni na pravilen način. V primeru samotestiranja prvi rezultati kažejo na nekoliko nižjo zanesljivost testov glede na tiste, ki jih opravijo usposobljeni zdravstveni delavci, kljub temu pa je občutljivost testov v primeru samotestiranja višja od 75 %, specifičnost pa višja od 99 %. To kaže, da je tudi samotestiranje izvedljiva možnost za odkrivanje okužb (11).

Odmevna je bila tudi demonstracija poslanca v avstrijskem parlamentu, kjer je z vzorcem kokakole sprožil pozitiven rezultat hitrega testa (12). Poročali so tudi o pozitivnih testih vzorcev živali in sadja. Naknadno so ugotovili, da so bili testi (namenoma?) izvedeni nepravilno. Vzorec kokakole na primer ni bil razredčen v priloženem pufru, kot predpisuje test, in je zaradi prenizke pH-vrednosti denaturiral protitelesa v testu, kar je povzročilo lažno pozitiven rezultat testa (13).

10. ZAKLJUČEK

S strokovnimi in z znanostjo podprtimi odgovori na najpogostejša vprašanja v zvezi s testiranjem na covid-19 smo skušali razjasniti nekatere dileme, ki se širijo v laični javnosti. Naš namen je bil, da čim bolj poljudno razložimo, zakaj nekateri koncepti, ki se morda sicer na prvi pogled zdijo popolnoma logični, ne zdržijo znanstvene presoje. Ovrgli smo tako trditve glede neprimernosti metode qPCR kot tudi trditve/strahove glede odvzema brisov iz nosno-žrelne votline. Poleg tega smo razložili, kakšno je najprimernejše ravnanje v primeru karantene, kako delujejo testi qPCR in hitri testi ter kako pravilno razlagati izsledke testiranj. Upamo, da smo s tem delom ponudili zdravstvenim delavcem dovolj kakovostnih informacij za delo s pacienti, ki se morda bojijo nekaterih bolj ali manj razširjenih zmot.

LITERATURA

1. Shampo, M. A.; Kyle, R. A. (2002). "Kary B. Mullis - Nobel Laureate for procedure to replicate DNA". Mayo Clinic Proceedings. 77 (7): 606.
2. John Lauritsen. Has Provincetown become Protease town? New York Native 9 Dec. 1996.
3. Stillfried S., Villwock S., Buelow R., Djudjaj S., Buhl M., Maurer A., Ortiz-Bruechle N., Celec P., Klinkhammer B., Wong D.W.L., Cacchi C., Braunschweig T., Knuchel R., Dahl E., Boor P. (2021). SARS-CoV-2 RNA screening in routine pathology specimens. Preprints from MedRxiv ; <https://doi.org/10.1101/2021.01.25.21250082>. Datum dostopa: 04. 04. 2021.
4. Johns Hopkins, Bloomberg school of public health: COVID-19 Testing: Understanding the "Percent Positive" - COVID-19 - Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health (jhsph.edu). Datum dostopa: 04. 04. 2021.
5. Center za nadzor in preventivo bolezni, ZDA: COVID-19: When to Quarantine | CDC. Datum dostopa: 04. 04. 2021.
6. Reuters fact check: Fact check: COVID-19 tests do not damage the hematoencephalic (blood-brain) barrier or cause brain inflammation. Datum dostopa: 04. 04. 2021.

7. Gupta K, Bellino PM, Charness ME. Adverse effects of nasopharyngeal swabs: Three-dimensional printed versus commercial swabs [published online ahead of print, 2020 Jun 11]. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2020;1.
8. Khanal R, Oli S, Lawal H, Bhandari B, Komanduri S. Nasopharyngeal Swab for COVID-19 Test Necessitating Mechanical Ventilation and Tracheostomy. *Cureus.* 2021;13(3):e13908.
9. Berger A, Nsoga MTN, Perez-Rodriguez FJ, Aad YA, Sattonnet-Roche P, Gayet-Ageron A, et al. (2021) Diagnostic accuracy of two commercial SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid tests at the point of care in community-based testing centers. *PLoS ONE* 16(3): e0248921.
10. Gnoth C, Johnson S. Strips of Hope: Accuracy of Home Pregnancy Tests and New Developments. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2014;74(7):661-669.
11. ECDC TECHNICAL REPORT, Considerations on the use of self-tests for COVID-19 in the EU/EEA, 17 March 2021. Datum dostopa: 19.5.2021.
12. ÖSTERREICH: FPÖ-Politiker will mit Cola beweisen, dass Corona-Schnelltests nutzlos sind. <https://www.youtube.com/watch?v=CKPIKwKpkcA>. Datum dostopa: 19.5.2021
13. USA Today, Fact check: Improper use of COVID-19 test gives false positive for Coca-Cola. <https://eu.usatoday.com/story/news/factcheck/2020/12/30/fact-check-wrong-use-covid-19-test-gives-false-positive-coke/4063231001/> Datum dostopa: 19.5.2021.

PRIHODNOST: NUTRIGENETSKI TESTI - PRIMER FOLATI

Tina Kek, dr. med.¹,

prof. dr. Ksenija Geršak, dr. med.^{1,2}

¹Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ginekološka klinika

²Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za ginekologijo in porodništvo

POVZETEK

Folati in folna kislina so nujno potrebni za sintezo DNA, RNA in presnovo aminokislin. Ker jih naše telo ne more sintetizirati samo, jih moramo v organizem vnesti s hrano. Kljub ustrezni prehrani je presnova folatov lahko motena zaradi prisotnosti polimorfizmov v genih, ki kodirajo različne encime folatnega cikla. Najbolj raziskan je encim 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR), ki sodeluje pri presnovi folatov in homocisteina. Do sedaj je poznanih več kot 40 točkovnih mutacij, najpogostejša pa sta polimorfizma 677CT in 1298AC. Mutirani aleli zmanjšujejo aktivnost encima in vodijo v zaplete v nosečnosti (napake v razvoju nevrčne cevi, preeklampsija, zastoj plodove rasti, abrupcija posteljice, ponavljajoči splavi). Prisotnost MTHFR polimorfizmov lahko preverimo z molekularno genetskim testiranjem v sklopu genetske obravnave za zdravstvene namene. Ker je pojavnost heterozigotnih in homozigotnih mutiranih genotipov v splošni populaciji relativno velika, je smiselno in utemeljeno sistematično dodajanje folatov vsakdanji prehrani za uspešno zaščito pred negativnimi učinki njihove motene presnove.

1. UVOD

Folat in folna kislina (FK) sta dve obliki vodotopnega vitamina B9. Ime folat izhaja iz latinske besede "folium", ki pomeni list. Folati se nahajajo v številnih vrstah zelenjave kot tudi v hrani živalskega izvora (zelena solata, špinača, zelje, brokoli, polnozrnata žita, jetra, jajca, oreščki, siri in nekatere vrste mesa). Ker jih naše telo ne more sintetizirati samo, jih moramo v organizem vnesti s hrano (1).

Folna kislina je sintetizirana oblika vitamina, ki vsebuje, poleg pterina in p-aminobenzojske kisline, le eno molekulo glutaminske kisline, zato jo imenujemo tudi pteroilglutaminska kislina.

Folati so esencialni za sintezo DNA in RNA ter presnovo aminokislin. Pomembnost folatov za zdrav potek nosečnosti smo začeli odkrivati že v tridesetih letih 20. stoletja. Angleška hematologinja in raziskovalka Lucy Wills je v Indiji opazovala nosečnice, pri katerih je pogosto odkrila makrocitno anemijo. Ugotovila je, da jo lahko učinkovito zdravi z izvlečki kvasa in jeter, za katere je bilo že takrat znano, da so bogat vir vitaminov B (2).

V šestdesetih letih prejšnjega stoletja so folate prvič povezali z deljenjem in rastjo celic (3). Nato sta po več desetletjih domnevanj o vlogi folatov pri preprečevanju neželenih izidov nosečnosti dve kontrolirani randomizirani študiji potrdili, da dodatki folne kisline lahko preprečijo nastanek napak nevralne cevi (4–6). Javnozdravstvene institucije so s pomočjo priporočil poskušale povečati preskrbo s folno kislino pri nosečnicah na tri načine:

- s povečanim vnosom hranil, bogatih s folno kislino,
- z dodajanjem folne kisline v obliki tablet in
- v nekaterih državah z obogatitvijo osnovnih živil s folno kislino.

Do sedaj je bilo uvedeno obvezno dodajanje folne kisline žitnim izdelkom v 76 državah po svetu. Najuspešnejša je Kanada, kjer so že po nekaj letih uspeli zmanjšati število rojenih otrok z napakami nevralne cevi (spina bifida) za 53 % (7). Evropske države se za zdaj za ta ukrep niso odločile, prevladuje pa dodajanje folne kisline v obliki tablet.

Prva slovenska priporočila so nastala leta 1995 in so ženskam v rodnem obdobju priporočala uživanje folne kisline v odmerku 0,4 mg/dan, z začetkom jemanja pred zanositvijo in do 12. tedna nosečnosti. V Preglednici 1 smo zbrali podatke o incidenci napak nevralne cevi za posamezna študijska obdobja od leta 1987 do 2019 (8–10, NPIS).

Preglednica 1: Incidenca napak nevralne cevi v Sloveniji (8–10, NPIS).

Časovno obdobje	Incidenca na 1000 rojenih otrok (živo-in mrtvorojeni)	Incidenca na 1000 rojenih otrok (živo-in mrtvorojeni, inducirani splavi)	Število rojenih otrok
1987–1995 (9 let)	0,56	--	--
1994–2003 (10 let)	0,54	0,74	135 (+ 65 splavov)
2002–2012 (11 let)	0,23	--	50
2015–2019 (5 let)	0,14	--	14

Zavedati se moramo, da padec v incidenci napak nevralne cevi ni samo posledica dodajanja folne kisline. Zmanjšanje je povezano z napredkom v zgodnjem prenatalnem odkrivanju plodov z razvojnimi napakami in v medicinski tehnologiji, ki omogoča večjo zmogljivost in ločljivost ultrazvočne opreme.

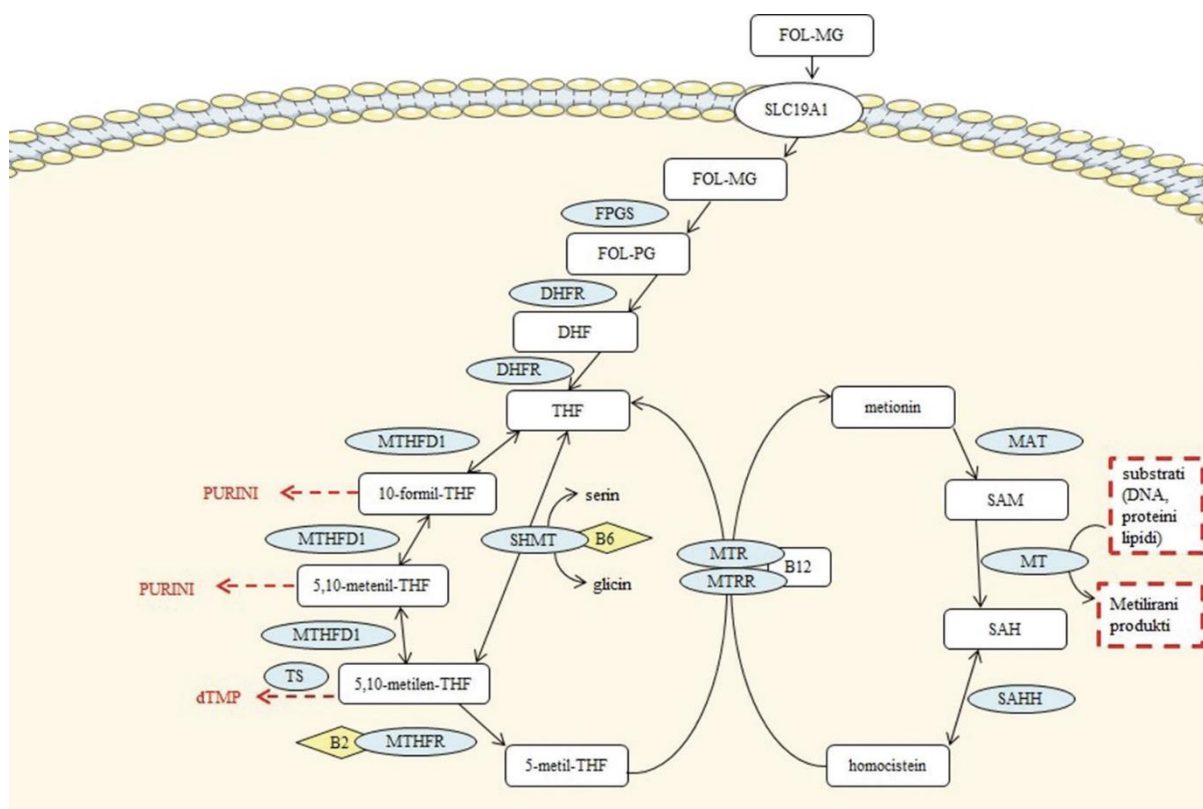
Žal uspehe prenatalnega varstva še vedno zmanjšujeta adherenca rednega jemanja dodatkov folne kisline, ki ohranja folatni status nosečnic nezadosten (11, 12), in genetska predispozicija.

Rezultati novejših študij, ko so avtorji preučevali patofiziologijo prirojenih napak in drugih zapletov v nosečnosti (spontani splavi, preeklampsija, abrupcija placente, zastoj rasti ploda, srčne napake in razcepi neba), kažejo, da je, poleg zmanjšane vnosa folatov, dejavnik tveganja za njihov pojav tudi zvečana vrednost homocisteina (13–19). Zvečan plazemski homocistein je bil vzročno povezan s poškodbami endotelijskih celic, kar lahko vodi v širok spekter bolezni (20). Hiperhomocistemija je lahko posledica nizkega prehranskega vnosa folatov in drugih B- vitaminov ali pa motenj v folatni presnovi, ki jih povzroči genetska predispozicija. Od genov, ki kodirajo encime, vključene v presnovo folatov, je bil do sedaj najbolj preučevan gen, ki kodira encim metilentetrahidrofolat reduktazo (MTHFR) (21–24).

2. PRESNOVA FOLATOV

Po zaužitju se folati absorbirajo v začetnem delu tankega črevesja, v dvanajstniku in jejunumu. V hrani so primarno v poliglutamati obliki in ne prehajajo celične membrane. Za vstop v celice je potrebna pretvorba folata v metiliran tetrahidrofolat (Slika 1). Začne se v enterocitih z encimom glutamat karboksipeptidaza II, ki hidrolizira poliglumat v monoglumat in s tem omogoči njegovo absorpcijo. V

primeru zaužitja folne kisline, sintetiziranega vira folatov iz prehranskih dodatkov, ta reakcija ni potrebna, saj je folna kislina monoglutamat (25).



Slika 1: Prikaz vstopa folata v celico, poliglutamacije in redukcije folatov, cikla presnove folatov in remetilacijskega cikla (25).

FOL-MG: folat monoglutamat; SLC19A1: folatni prenašalec; FPGS: folilpoliglutamat sintetaza; FOL-PG: folat poliglutamat; DHFR: dihidrofolat reduktaza; DHF: dihidrofolat; THF: tetrahidrofolat; MTHFD1: metilentetrahidrofolat dehidrogenaza 1; MTHFR: 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza; MTRR: metionin sintaza reduktaza; MTR: metionin sintaza; MAT: metionin adenziltransferaza; SAM: S-adenzil metionin; MT: metiltransferaza; SAH: S-adenzil homocistein; SAHH: S-adenzil homocistein hidrolaza; dTMP: deoksitimidin monofosfat; TS: timidilat sintaza; SHMT: serin hidroksimetiltransferaza.

Molekule monoglutamata vstopijo v celice z aktivnim transportom preko prenašalca reduciranega folata. V citoplazmi se ponovno poliglutamirajo, ker v taki obliki ne prehajajo iz celice in so ustrežnejši substrat za encime. Poliglutamacijo katalizira encim folilpoliglutamat sintetaza (FPGS), nato pa encim dihidrofolat reduktaza (DHFR) omogoči redukcijo dihidrofolata (DHF) v tetrahidrofolat (THF) (Slika 1). V cikel presnove folatov, ki je sklopljen s presnovo vitamina B12 in remetilacijskim ciklom, vstopajo poliglutamirani in reducirani metaboliti folatov (25). Biološko aktivna oblika folata je tetrahidrofolat (THF), ki lahko neposredno vstopa v sintezo purinov ali pa se pretvori v 5,10-metilentetrahidrofolat (5,10-metilen-THF) preko delovanja encima serin hidroksi metiltransferaze (SHMT) in kofaktorja vitamina B6. **5,10-metilen-THF** je osrednja molekula v metabolizmu folatov in substrat za pretvorbo deoksiuridin

monofosfata (dUMP) v deoksitimidin monofosfat (Slika 1, dTMP), ki je neposredno povezan s sintezo DNA. Vstopa tudi v cikel presnove homocisteina, ko se s pomočjo encima 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) in kofaktorja vitamina B2 pretvori v **5-metiltetrahidrofolat (5-metil-THF)** in je substrat v reakciji pretvorbe homocisteina v metionin, ki jo katalizira encim metionin sintaza (MTR). Metionin se ob tem pretvori v S-adenozil metionin (SAM), ki je glavni donator metilne skupine za metilacijske reakcije lipidov, proteinov in DNA. Z oddajo metilne skupine se SAM preoblikuje v S-adenozil homocistein (SAH), ta pa v homocistein (Slika 1) (25).

3. METILTETRAHIDROFOLAT REDUKTAZA (MTHFR)

MTHFR je ključni encim metabolizma folatov in homocisteina. Nahaja se v citoplazmi in katalizira pretvorbo 5,10-metilen-THT v 5-metil-THF. 5-metil-THF se lahko usmeri v sintezo purinov ali v sintezo metionina in tako vpliva na sintezo ali metilacijo DNA.

Gen za encim MTHFR se nahaja na kratkem kraku kromosoma 1. Do sedaj je poznanih več kot 40 točkovnih mutacij, najpogostejša in najbolj raziskana sta polimorfizma 677CT in 1298AC (Preglednica 2). Odkrita sta bila pred približno 20 leti in sta povezana z blago do zmerno hiperhomocisteinemijo (26). Po njunem odkritju so sledile obširne raziskave, ki so iskale povezave med polimorfizmi MTHFR in različnimi bolezenskimi stanji, predvsem kardiovaskularnimi boleznimi, trombozami, razvojnimi napakami, zapleti v nosečnosti, tveganjem za razvoj raka in psihiatričnimi boleznimi (27).

Preglednica 2: Aktivnost encima MTHFR glede na genotip (25).

Genotip	Nemutirani homozigot 677CC	Heterozigot 677CT	Mutirani homozigot 677TT
Nemutirani homozigot 1298AA	100 %	60 %	30 %
Heterozigot 1298AC	80 %	50-60 %	np*
Mutirani homozigot 1298CC	60 %	np*	np*

np:redki posamezni primeri*

Pri **polimorfizmu 677CT** (rs1801133) je nukleotid citozin zamenjan s timinom na mestu 677. Sprememba povzroči vgraditev aminokislina valina namesto alanina na mestu 222 v proteinu, kar vodi v zmanjšano aktivnost encima (Preglednica 2).

V primerjavi z aktivnostjo encima pri nemutiranem genotipu imajo homozigoti 677TT za 70 % zmanjšano aktivnost encima in heterozigoti do 40 % (Preglednica 2). Če je hkrati prisoten majhen vnos folatov s hrano, vodi zmanjšana aktivnost do znižanih plazemskih vrednosti folatov, vitamina B12 ter zvišane vrednosti homocisteina. Nižja aktivnost encima MTHFR vodi tudi v večjo razpoložljivost gradnikov za DNA sintezo in hipometilacijo proteinov, lipidov in DNA, kar je povezano z napačno vezavo nukleotidov, poškodbami DNA vijačnice in genetsko nestabilnostjo (25). Posledica je nastanek **razvojnih nepravilnosti**, predvsem **napake nevralne cevi**. Pojavnost polimorfizma 677CT je populacijsko različna. V severnih državah Evrope je približno 12 % homozigotov 677TT, v južni Evropi do 24 %. V Sloveniji je mutiranih homozigotov z genotipom 677TT 10 %, heterozigotov 677CT 46 %. Nemutiranih homozigotov s popolno aktivnostjo encima MTHFR je v Sloveniji 42 % (Preglednica 3) (25).

Polimorfizem 1298AC (rs1801131) je drugi najpogostejši in nastane z zamenjavo adenina s citozinom na mestu 1298, kar povzroči zamenjavo glutamata z alaninom na mestu 429 v proteinu. Aktivnost encima je pri homozigotih 1298CC zmanjšana za 40 %, pri heterozigotih pa za 20 % glede na aktivnost encima brez mutacije (Preglednica 2). Polimorfizem ne vpliva bistveno na koncentracijo homocisteina in folata, vendar v primeru majhnega folatnega vnosa ali povečanih potreb po folatu vseeno spreminja njihovo presnovo. V slovenski in evropski populaciji je pogostost homozigotov 1298CC okoli 11-%. Pogostost heterozigotov 1298AC je v Sloveniji 42-%, genotip 1298AA s popolno aktivnostjo encima pa ima le 47 % populacije (Preglednica 3) (25).

Pri osebah, ki so **sestavljene heterozigoti (genotip 677CT/1298AC)**, je bila ugotovljena zmanjšana aktivnost encima za 40–50 % (Preglednica 2). Kaže se z zvečano koncentracijo homocisteina in zmanjšanimi vrednostmi folatov v krvi. V Sloveniji je sestavljenih heterozigotov okrog 20 % (Preglednica 3). Več študij je preučevalo povezavo med sočasno prisotnima polimorfizmoma MTHFR in **zapleti v nosečnosti** (prirojene nepravilnosti, preeklampsija, zastoj plodove rasti, abrupcija posteljice, ponavljajoči splavi). Prve analize so dokazale od 2- do 5-krat večje tveganje za rojstvo otroka z napako nevralne cevi. Novejši rezultati ne dajejo tako jasnih zaključkov. Tudi nedavno objavljena metaanaliza je pokazala zmeren vpliv sestavljenih heterozigotnih alelov na zaplete v nosečnosti (20). Seveda moramo upoštevati, da na patofiziološke posledice polimorfizmov MTHFR pomembno vplivajo tudi demografski in okoljski dejavniki, kot so splošni folatni status, starost, kajenje in vnos alkohola, ki lahko spremenijo krhko ravnotežje presnove folne kisline (28).

Preglednica 3: Pojavnost polimorfizmov MTHFR v različnih populacijah, izraženo v deležu [%]/(25).

Populacije	677 genotip			1298 genotip			Sestavljen heterozigot
	Nemutiran homozigot	Heterozigot	Mutiran homozigot	Nemutiran homozigot	Heterozigot	Mutiran homozigot	
Slovenci	CC 42	CT 46	TT 10	AA 47	AC 42	CC 11	677CT/1298AC 20
Kavkazijci	29-54	39-51	4-27	44-48	41-46	10-12	15-23
Hispanci	18-45	47-50	18-30	50-66	27-34	2-6	15
Afričani	78	20	2	68	29	3	4
Azijci	31-62	35-53	3-20	49-68	30-47	2-4	14-15

Ostale alelne kombinacije so redke, do sedaj je bilo v slovenski populaciji ugotovljenih le nekaj posameznikov z genotipom 677TT/1298AC, genotipom 677CT/1298CC ter genotipom 677TT/1298AC (Preglednica 2) (25). Genotip 677TT/1298CC je izjemno redek.

Epidemiološko ostaja pomemben delež populacije z genotipom 677TT/1298AA (10 %), ki ima samo 30 % normalne encimske aktivnosti. Zmanjšano encimsko aktivnost lahko uspešno uravnatežijo visoke znotrajcelične vrednosti folatov (28). Hkrati pa se moramo zavedati, da se z napredkom v znanju vse bolj poudarja poligenetski nastanek razvojnih nepravilnosti, na katere pomembno vplivajo dejavniki okolja.

4. GENETSKA OBRAVNAVA IN NUTRIGENETSKI TESTI

Prisotnost polimorfizmov MTHFR lahko preverimo z molekularno genetskim testiranjem, ki je v Sloveniji dostopno vsakemu zavarovancu v sklopu genetske obravnave za **zdravstvene namene**, v javnih in zasebnih zavodih s koncesijo, in ustreznimi laboratoriji. Celostna genetska obravnava omogoča dokazovanje različnih motenj presnove in redkih bolezni.

Med glavnimi **indikacijami** za ugotavljanje prisotnosti polimorfizmov v genih, ki so udeleženi v presnovi folatov, so ponavljajoči se spontani splavi, predhodna nosečnost ali rojstvo otroka s prirojenimi razvojnimi nepravilnostmi, nekateri zapleti v nosečnosti (na primer: preeklampsija, abrupcija posteljice, mrtvorojenost) in motnje strjevanja krvi.

Genetsko obravnavo predlaga preiskovanki oz. paru izbrani družinski zdravnik ali specialist posamezne stroke. Nato se klinični genetik na genetskem posvetu glede na anamnestične podatke, klinično sliko in ustrezne laboratorijske biokemične analize odloči in predlaga usmerjeno genetsko testiranje. Praviloma izbere več testov za različne polimorfizme v enem ali več genih, lahko se odloči za analizo dela eksoma ali celotnega genoma (29). Ob tem predlaga tudi način vzorčenja, ki je pri odrasli populaciji praviloma odvzem krvi, redkeje pa bris bukalne sluznice ali biopsija različnih tkiv.

Genetski posvet obvezno vključuje tudi postopke za pridobivanje obveščene soglasja ter varovanje zaupnosti in zasebnosti. V nasprotju z večino laboratorijskih preiskav je izvid genetskega testiranja dokončen in ugotovljena sprememba ostane v dednem zapisu vse življenje. Ob tem se razkrijejo tudi informacije o drugih družinskih

članih v krvnem sorodstvu in tako odpirajo dileme, komu vse so lahko dostopni. Zato se po ustreznem informiranju vsak posameznik sam dokončno odloči za testiranje ali proti temu. Z uporabo različne metodologije so rezultati znani v nekaj dneh oz. po več mesecih, sledita jim razlaga in priprava individualnega mnenja.

Za vsak genetski test mora biti znan proizvajalec, nujna je opredelitev analitične občutljivosti in specifičnosti ter klinične občutljivosti in specifičnosti.

Naštete lastnosti morajo biti čim boljše oziroma njihove vrednosti čim višje. Na analitični del vplivata način rokovanja z vzorcem in tehnično izvajanje samega testiranja. Klinično veljavnost pa moti znižana penetranca – kljub pravilno ugotovljenemu genotipu fenotip ni značilno izražen. In obratno, s testom ne ugotovimo iskane genetske spremembe kljub značilnemu fenotipu, ker poleg testiranega gena lahko povzročajo bolezen še drugi geni, druge spremembe v istem genu ali pa je pri preiskovancu prisoten mozaicizem (29).

Samotestiranje je verjetno del prihodnosti na področju genetskega testiranja. Vendar na trenutni stopnji razvoja tudi ob pomoči umetne inteligence ne more nadomestiti celostne genetske obravnave, ustrezne razlage in individualnega pristopa k posameznemu preiskovancu in njegovim osebnim stiskam.

5. PRIPOROČILA

Ker je pojavnost heterozigotnih in homozigotnih mutiranih genotipov v splošni populaciji relativno velika, je smiselno in utemeljeno sistematično dodajanje folatov vsakdanji prehrani za uspešno zaščito pred negativnimi učinki motene presnove folatov. V zaključni fazi je priprava posodobljenih slovenskih priporočil za jemanje folne kisline, ki vključujejo predkonceptijsko jemanje, priporočene odmerke za zdravo nosečnico in zdravo doječo mater ter za posebne skupine nosečnic s spremljajočimi boleznimi ali nekaterimi rizičnimi dejavniki (epilepsija, sladkorna bolezen, kronična vnetna črevesna bolezen, debelost, obremenilna družinska anamneza in genetska obremenitev) (Preglednica 4).

Preglednica 4: Predvideni dnevni odmerki folne kisline za zdrave nosečnice, bolnice z nekaterimi kroničnimi boleznimi ali rizičnimi dejavniki in za doječe matere.

Zdravstveno stanje	Odmerek	Časovno obdobje
zdrava nosečnica	0,4 mg/ dan	pred zanositvijo, vsaj prvih 12 tednov
bolnica z epilepsijo, sladkorno boleznijo, obremenilno osebno anamnezo za prirojene razvojne nepravilnosti	4 mg/ dan	1–3 mesece pred zanositvijo, prvih 12 tednov
	0,4 mg/ dan	po 12. tednu in do poroda
bolnica s KVČB ali obremenilno družinsko anamnezo za prirojene razvojne nepravilnosti	1 mg/ dan	1–3 mesece pred zanositvijo, prvih 12 tednov
	0,4 mg/ dan	po 12. tednu in do poroda
debelost	0,4 mg/ dan	pred zanositvijo, vsaj prvih 12 tednov
doječa mati	0,4–0,53 mg/ dan*	12 tednov po porodu

*KVČB: kronična vnetna črevesna bolezen; * različna evropska priporočila niso enotna*

6. ZAKLJUČEK

Redno jemanje priporočenih odmerkov folne kisline ter ustrezna prehrana sta primerni in zadostni preventivi za zdrave nosečnice. V primerih obremenilne družinske ali osebne anamneze, ob spremljajočih bolezenskih stanjih (30) in spremenjenih krvnih koncentracijah homocisteina in folatov, je potrebno ustrezno svetovanje z dodatnimi diagnostičnimi postopki. Pri dokazanem polimorfizmu, ki vodi v zmanjšano aktivnost encima MTHFR, pa je smiselno nadomeščanje folatov z aktivno obliko 5-metil-THF (25, 31).

LITERATURA

1. Farkaš-Lainščak J, Novak-Antolič Ž, Hlastan-Ribič C, Zaletel-Kragelj L. Javnozdravstveni vidiki preprečevanja napak nevalne cevi s folno kislino. *Zdrav Var.* 2009; 48: 114-21.
2. Wills, Lucy. Treatment of 'Pernicious Anaemia of Pregnancy' and 'Tropical Anaemia'. *Br Med J.* 1931; 1(3676): 1059-64.
3. Hibbard, Bryan. The Role of Folic Acid in Pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol: International J Obstet Gynaecol.* 1964; 71: 529-42.
4. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet.* 1991; 338(8760): 131-7.
5. Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med.* 1992; 327(26): 1832-5.
6. Andrew E. Czeizel. Folate Deficiency and Folic Acid Supplementation: The Prevention of Neural-Tube Defects and Congenital Heart Defects. *Nutrients.* 2013; 5: 4760-75.
7. Wilson RD; Genetics Committee, Wilson RD, Audibert F, Brock JA, Carroll J, Cartier L, et al. Pre-conception Folic Acid and Multivitamin Supplementation for the Primary and Secondary Prevention of Neural Tube Defects and Other Folic Acid-Sensitive Congenital Anomalies. *J Obstet Gynaecol Can.* 2015; 37(6): 534-52.
8. Kokalj, T. S., Rejc, B., Gersak, K. Incidence and prevention of neural tube defects in Slovenia. *Eu J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011; 156(1): 119-20.
9. Farkaš-Lainščak J, Novak-Antolič Ž, Hlastan-Ribič C, Zaletel-Kragelj L. Javnozdravstveni vidiki preprečevanja napak nevalne cevi s folno kislino. *Zdrav Var.* 2009; 48: 114-21.
10. Pušenjak S, Gajšek Salobir U, Novak - Antolič Ž, Tul N. Preprečevanje nepravilnosti v razvoju nevalne cevi pri plodu. *Zdrav Var.* 1998; 37: 521-22.
11. Chitayat D. Folic Acid Supplementation for Pregnant Women and Those Planning Pregnancy: 2015 Update. *J Clin Pharmacol.* 2016; 56(2): 170-5.
12. Sherwood LK, Houghton LA, Tarasuk V, O'Connor DL. One third of pregnant and lactating women may not be meeting their folate requirements from diet alone based on mandated levels of folic acid fortification. *J Nutr.* 2006; 136: 2820-6.
13. Dudman NP, Temple SE, Guo XW, Fu W, Perry MA. Homocysteine enhances neutrophil-endothelial interactions in both cultured human cells and rats in vivo. *Circ Res.* 1999; 84: 409-16.
14. Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation.* 2001; 103: 2717-23.
15. Ota K, Takahashi T, Han A, Damvaeba S, Mizunuma H, Kwak-Kim J. Effects of MTHFR C677T polymorphism on vitamin D, homocysteine and natural killer cell cytotoxicity in women with recurrent pregnancy losses. *Hum Reprod.* 2020; 35(6): 1276-1287.
16. Facco F, You W, Grobman W. Genetic thrombophilias and intrauterine growth restriction: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2009; 113(6): 1206-16.
17. Zhang T, Lou J, Zhong R, et al. Genetic variants in the folate pathway and the risk of neural tube defects: a meta-analysis of the published literature. *PloS One.* 2013; 8(4): e59570.
18. Rai V, Yadav U, Kumar P, Yadav SK, Mishra OP. Maternal methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and Down syndrome risk: a meta-analysis from 34 studies. *Plos One.* 2014; 9(9): e108552.
19. Karas Kuželički N, Šmid A, Kek T, Eberlinc A, Geršak K, Mlinarič-Raščan I. Common polymorphism in the glycine N-methyltransferase gene as a novel risk factor for cleft lip with or without cleft palate. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2018; 47(11): 1381-8.

20. Zhang Y, He X, Xiong X, Chuan J, Zhong L, Chen G, & Yu D. The association between maternal methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphism and birth defects and adverse pregnancy outcomes. *Prenatal Diagnosis*. 2019; 39: 3–9.
21. Yang Y, Luo Y, Yuan J, et al. Association between maternal, fetal and paternal MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms and risk of recurrent pregnancy loss: a comprehensive evaluation. *Arch Gynecol Obstet*. 2016; 293(6): 1197-211.
22. Rai V. Methylenetetrahydrofolate reductase gene A1298C polymorphism and susceptibility to recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2014; 60(2): 27-34.
23. Wu X, Yang K, Tang X, et al. Folate metabolism gene polymorphisms MTHFR C677T and A1298C and risk for preeclampsia: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2015; 32(5): 797-805.
24. Chen J, Chen L, Zhu LH, Zhang ST, Wu YL. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism with preterm delivery and placental abruption: a systematic review and meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2016; 95(2): 157-65.
25. Vidmar M, Grželj J, Geršak K, Mlinarič-Raščan I. Spremenjena aktivnost encima 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) kot dejavnik tveganja za številne bolezni. *Zdrav Vestn*. 2016; 85: 324–37.
26. Kang S S, Wong P W, Susmano A, Sora J, Norusis M, & Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: An inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Gen*. 1991; 48(3): 536–45.
27. Levenseller Levin B, Varga E. MTHFR: Addressing Genetic Counseling Dilemmas Using Evidence-Based Literature. *J Genet Counsel*. 2016; 25: 901–11.
28. Ulvik A, Ueland PM, Fredriksen A, et al. Functional inference of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T and 1298A > C polymorphisms from a large-scale epidemiological study. *Hum Genet* 2007;121:57–64.
29. Geršak K. Genetsko svetovanje in prenatalna diagnostika. In: Takač I, Geršak K, eds. *Ginekologija in perinatologija*. Maribor, Univerza v Mariboru: 2016. pp.447-54.
30. Pannia E, Cho CE, Kubant R, Sánchez-Hernández D, Huot PS, Harvey Anderson G. Role of maternal vitamins in programming health and chronic disease. *Nutr Rev*. 2016; 74(3): 166-80.
31. Vidmar Golja M, Šmid A, Karas Kuželički N, Trontelj J, Geršak K, Mlinarič-Raščan I. Folate Insufficiency Due to MTHFR Deficiency Is Bypassed by 5-Methyltetrahydrofolate. *J Clin Med*. 2020; 9(9): 2836.

PRIHODNOST: FARMAKOGENOMIKA ZDRAVIL

izr. prof. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo,

POVZETEK

Glavni namen farmakogenomike je prilagoditi terapijo z zdravili posameznemu bolniku z namenom optimizacije varnosti in učinkovitosti terapije. Pri implementaciji farmakogenomike v klinično prakso so primarnega pomena smernice za uporabo farmakogenetskih markerjev pri prilagoditvi terapije, ki jih izdajata Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) in Clinical Pharmacogenetic Implementation Consortium (CPIC). DPWG je sestavila seznam genov in polimorfizmov z velikim kliničnim vplivom na odziv na pogosto predpisovana zdravila (PGx Passport). Le-ta obsega 58 variantnih alelov v 14 genih, ki vplivajo na odziv na 49 pogosto uporabljenih zdravil. V zadnjem desetletju se je razmahnilo farmakogenetsko testiranje prek spleta. Glavna kritika stroke glede takšnega testiranja temelji na odsotnosti strokovnjakov pri svetovanju in razlagi rezultatov testiranja, poleg tega se kriteriji za vključitev polimorfizmov in genov v testni panel pri spletnih ponudnikih razlikujejo od vključitvenih kriterijev DPWG in CPIC. V prihodnosti bodo imeli lekarniški farmacevti pomembno vlogo kot vmesni člen med uporabniki in ponudniki farmakogenetskih testiranj prek spleta. Čeprav so raziskave pokazale, da imajo lekarniški farmacevti večinoma pozitiven odnos do farmakogenetskega testiranja, pa se jih večina ne čuti kompetentnih za interpretacijo rezultatov tovrstnega testiranja. V sled navedenemu je treba poskrbeti za ustrezno izobraževanje na tem področju tako za bodoče kot že aktivne lekarniške farmacevte.

1. UVOD

Osnovne principe farmakogenetike je že leta 1909 postavil britanski zdravnik sir Archibald E. Garrod v svojem revolucionarnem delu *The Inborn Errors of Metabolism*, kjer ugotavlja, da je vsako zdravilo lahko strup v dovolj visokem odmerku ter da se posamezniki lahko zelo različno odzovejo na enak odmerek zdravilne učinkovine. Garrodove ugotovitve zelo dobro povzemajo definicijo farmakogenetike, ki se je kot samostojna veda začela razvijati šele v osemdesetih letih 20. stoletja, kar sovпада z razvojem genotipizacijskih metod, kot sta Sangerjevo sekvenciranje in pomnožitvena reakcija s polimerazo (PCR). Temelje farmakogenetike kot samostojne vede je leta 1957 uvedel profesor genetike na Univerzi v Washingtonu Arno Motulsky, ki velja za »očeta farmakogenetike«, izraz farmakogenetika pa je leta 1959 skoval nemški genetik Friedrich Vogel z Univerze v Heidelbergu (1). Pravi zagon in potencial za dejansko implementacijo v klinično prakso pa je farmakogenetika dobila z dokončanjem Projekta človeški genom v začetku 21. stoletja.

V začetku 21. stoletja se je poleg izraza farmakogenetika, ki se ukvarja s spremembami genov za encime, ki presnavljajo zdravilne učinkovine, pojavil tudi izraz farmakogenomika, ki naj bi obsegal tudi druge farmakogenetske markerje, kot so prenašalci in tarčne molekule zdravilnih učinkovin (2). Glavni namen farmakogenetike/genomike je torej prilagoditi terapijo z zdravili posameznemu bolniku z namenom optimizacije varnosti in učinkovitosti terapije. Kasneje se je princip individualizacije s farmakoterapije razširil tudi na druge terapevtske pristope, kar zajema izraz personalizirana medicina, v zadnjih nekaj letih pa smo poleg genomskih pristopov za individualizacijo terapije začeli uporabljati druge -omike (metabolomika, proteomika, transkriptomika in epigenetika), kar pa zajema pojem precizna medicina.

2. RAZVOJ FARMAKOGENETIKE IN KLINIČNE SMERNICE

Prvi primeri uporabe farmakogenetike v praksi segajo v čas druge svetovne vojne, ko so ZDA svoje vojake pošiljale na bojišča po vsem svetu, tudi na področja z endemično malarijo. Pri preventivni uporabi antimalarikov pri vojaki so pri približno 10 % Afroameričanov opazili hud neželeni učinek zdravila, ki se je kazal kot obsežna intravaskularna hemoliza. Kasneje so ugotovili, da imajo omenjeni vojaki pomanjkanje glukoza-6-fosfat dehidrogenaze zaradi mutacij v G6PD genu (1). Gre za najpogostejšo presnovno motnjo pri človeku, ki so jo opazili že v antiki zaradi nezmožnosti uživanja nekaterih stročnic (favizem), za katero trpi 400 milijonov ljudi. Pomanjkanje encima povzroča manjšo produkcijo NADPH, ki je nujno potreben za regeneracijo glutationa. Ker imajo osebe s pomanjkanjem G6PD nižje koncentracije glutationa v eritrocitih, so le-ti občutljivejši na oksidante, ki jih zaužijemo v obliki hrane ali zdravil. Okvara je

najpogostejša na področjih z malarijo, saj imajo heterozigoti delno odpornost proti malariji. Povezava med G6PD in antimalariki je relevantna tudi danes, saj je pogostost okvare največja ravno v populacijah, kjer se antimalariki najbolj uporabljajo (1).

V 70. in 80. letih 20. stoletja je večina raziskav obsegala gene, ki kodirajo za citokrome, predvsem CYP2D6, 2C19 in 2C9. Omenjeni geni še danes obsegajo največji delež farmakogenetskih preiskav, saj so odgovorni za presnovo velikega števila zdravil. Kasneje so poleg CYP začeli preiskovati tudi druge zdravila presnavljajoče encime, kot so tiopurin-S-metil transferaza (TPMT), ki deaktivira tiopurinska zdravila, UDP-glukuronil transferaza (UGT1A1) in dihidropirimidin dehidrogenaza (DPYD), ki sodelujeta pri presnovi nekaterih pomembnih zdravil, na primer citostatikov irinotekana in 5-fluoro uracila (1). V 21. stoletju se fokus z encimov premika na prenašalce zdravil (SLCO1B1 v povezavi s statini in metotreksatom) in tarčne molekule. Zdravilna učinkovina proti raku gefitinib je na primer učinkovita le pri bolnikih z mutacijo v genu za receptor za epidermalni rastni faktor (EGFR oz. HER1), ki kodira receptor za epidermalni rastni faktor, katerega zaviralec je gefitinib (3).

Kljub številnim odkritim pomembnim povezavam gen-zdravilo pa je bila glavna ovira pri implementaciji omenjenih spoznanj v klinično prakso pomanjkanje standardizacije in konkretnih smernic za uporabo farmakogenetskih markerjev pri prilagoditvi terapije v skupini bolnikov s specifično diagnozo. S tem namenom sta bili ustanovljeni Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG), katere priporočila se implementirajo predvsem na območju Evropske unije (EU), in Clinical Pharmacogenetic Implementation Consortium (CPIC), ki deluje predvsem v Združenih državah Amerike (ZDA). Od leta 2005 je DPWG sistematično pregledala 97 potencialnih interakcij gen-zdravilo, od tega jih je 54 opredelila kot potencialno klinično relevantnih. Vzporedno je CPIC izdala priporočila za več kot 40 zdravil (4). Priporočila DPWG in CPIC so si zelo podobna, niso pa identična – trenutno potekajo naporji za harmonizacijo le-teh (5). Najobsežnejša baza podatkov s področja farmakogenomike, ki združuje priporočila DPWG, CPIC in Ameriškega vladnega urada za zdravila in prehrano (FDA), je Pharmacogenomics knowledge base (PharmGKB) (6). PharmGKB je bila ustanovljena leta 2000 na Univerzi Stanford, financira pa jo National Institutes of Health (NIH). Najpomembnejša informacija za klinike, ki jo ponuja PharmGKB, so klinične anotacije. Le-te dajo informacijo o tem, kako močna je povezava med genom (polimorfizmom) in določenim zdravilom. Klinične anotacije imajo šest stopenj: 1A, 1B, 2A, 2B, C in D. Pari gen-zdravilo z anotacijo 1A imajo zelo dobro dokazano povezavo oziroma vpliv določenega polimorfizma na odziv na specifično zdravilo in imajo skoraj vedno CPIC smernice za klinično implementacijo, pri tistih z anotacijo D pa povezava ni bila dokazana ali pa je bila dokazana na majhnem številu bolnikov oziroma na *in vitro* modelih (6).

3. IMPLEMENTACIJA FARMAKOGENOMIKE V KLINIČNO PRAKSO

3.1. Vpeljava farmakogenomike v primarno zdravstveno oskrbo

Prvi uspešni primeri vpeljave farmakogenomike v klinično prakso so se zgodili v primerih zdravil z ozkim terapevtskim oknom, kot so na primer citostatiki. Gre za zdravljenje bolezni, ki so življenje ogrožajoče (rak) in zahtevajo specialistično obravnavo. Ravno zato so vsaj desetletje po zelo uspešni vpeljavi farmakogenetskega testiranja bolnikov na tiopurinski terapiji z akutno limfoblastno levkemijo, vnetnimi črevesnimi boleznimi, avtoimunskimi boleznimi in po transplantaciji organov farmakogenetske preiskave obdržale butično naravo in bile rezervirane za majhno skupino bolnikov na sekundarni in terciarni ravni zdravstvene oskrbe.

Šele v zadnjem desetletju pa uporaba farmakogenetskih pristopov prodira tudi v primarno zdravstveno oskrbo in se uporablja pri predpisovanju pogosto uporabljanih zdravil v splošni populaciji (npr. antidepresivi, antitrombotiki, antipsihotiki, zaviralci protonske črpalke, statini, antiaritmiki, hormonska terapija, ...). Poudariti je treba, da se farmakogenetski pristopi pri obravnavi življenje ogrožajočih bolezni zdaj uporabljajo v večini dobro in srednje razvitih držav, medtem ko je uporaba farmakogenetike na primarni ravni omejena samo na določene države, kjer prednjačita Nizozemska in ZDA. Kot kažejo izkušnje iz teh držav, so za uspešno implementacijo farmakogenetike na primarno raven zdravstva nujno potrebni ustrezna infrastruktura (predvsem v smislu računalniške mreže elektronske baze podatkov), multidisciplinarni timi strokovnjakov (zdravnik, farmacevt, laboratorijski delavec, klinični genetik), ustrezne klinične smernice (npr. CPIC), ustrezna izobraženost strokovnjakov in bolnikov ter multidisciplinarno vodenje in nadzor takih programov (7).

3.2. Projekt »PGx Passport«

Nizozemska je danes verjetno najuspešnejša država na področju implementacije farmakogenetike na primarni zdravstveni ravni, saj gre za iniciativo na državni ravni pod imenom Projekt PGx Passport (5). Obstajata dva pristopa pri farmakogenetskem testiranju v diagnostične namene:

- Predterapevtsko testiranje enega gena (ali manjšega števila genov) izvedemo samo pred začetkom terapije ali med terapijo z določenim zdravilom. Informacijo farmakogenetskega testiranja uporabimo takoj.
- Preemptivno testiranje večjega števila (panela) genov izvedemo pri zdravih posameznikih, ki še nimajo predpisanega zdravila. Informacijo farmakogenetskega testiranja uporabimo v prihodnosti, če se pri posamezniku pokaže potreba po jemanju določenega zdravila.

Projekt PGx Passport uporablja drugi pristop in v ta namen je DPWG sestavila seznam genov in polimorfizmov z velikim kliničnim vplivom na odziv na pogosto predpisovana zdravila. Vključitveni kriteriji za polimorfizme vključujejo: obstoječe smernice DPWG, dokazan funkcijski vpliv polimorfizma na protein, frekvenca redkejšega alela (MAF) v splošni populaciji je ≥ 1 %. V PGx Passport panel so vključeni tudi nekateri polimorfizmi z $MAF < 1$ % pod pogojem, da je njihova MAF v specifični subpopulaciji (Afričani, Azijci, Kavkazci) ≥ 1 %, ali če obstajajo zelo močni dokazi za povezavo med polimorfizmom in odzivom na zdravilo. V končni panel je tako vključenih 58 variantnih alelov v 14 genih, ki vplivajo na odziv na 49 pogosto predpisovanih zdravil (Preglednica 1).

Od 49 zdravil jih je največ iz skupine antidepresivov ($n = 10$), sledijo imunosupresivi in citostatiki ($n = 5$), zdravila za zdravljenje infekcij, antikoagulantni, antiepileptiki, antipsihotiki ($n = 4$), zaviralci protonske črpalke ($n = 3$), antiaritmiki, analgetiki, zdravila za zniževanje lipidov ($n = 2$), antihipertenzivi, psihostimulansi, zdravila za Gaucherjevo bolezen in kontraceptivi ($n = 1$).

Avtorji ocenjujejo, da bo 50 % Nizozemcev, starejših od 65 let, v naslednjih 4 letih potrebovalo vsaj eno zdravilo iz nabora, 25 % pa jih bo potrebovalo dve ali več, kar kaže na veliko praktično uporabnost in ekonomsko upravičenost omenjenega pristopa. Ob tem se je treba zavedati, da je nabor genov in polimorfizmov dinamičen in da se bo zaradi novih študij in znanstvenih spoznanj število vključenih polimorfizmov, genov in zdravil s časom povečevalo (5).

Preglednica 1: Polimorfizmi, geni in zdravila, vključeni v PGx Passport panel (5).

Gen	Variantni aleli	Vpliv na protein	Zdravilne učinkovine
CYP2B6	*4,*5,*6,*9,*16,*18	Zmanjšana aktivnost	Efavirenz
CYP2C9 #	*2,*3,*5,*11	Zmanjšana aktivnost	Fenitoin, Varfarin
CYP2C19 #	*2,*3,*4A/B,*5,*6,*8 *9,*10	Zmanjšana aktivnost	Klopidogrel Citalopram Escitalopram Sertralin Imipramin
	*17	Povečana aktivnost	Lansoprazol Omeprazol Pantoprazol Vorikonazol
CYP2D6 #	*xN	Povečana aktivnost	Amitriptilin Aripiprazol Atomoksetin Klomipramin Kodein
	*3,*4,*5,*6,*8,*9,*10, *14A,*14B,*17,*41	Zmanjšana aktivnost	Doksepin Eliglustat Flekainid Haloperidol Imipramin Metoprolol Nortriptilin Paroksetin Pimozid Propafenon Tamoksifen Tramadol Venlafaksin Zuklopentiksol
CYP3A5 #	*3,*6,*7	Zmanjšana aktivnost	Takrolimus
DPYD #	*2A,*13, 2846A>T, 1236G>A	Zmanjšana aktivnost	5-Fluorouracil Kapecitabin Tegafur

Gen	Variantni aleli	Vpliv na protein	Zdravilne učinkovine
F5	1691G>A	Zmanjšana aktivnost	Estrogenska horm. kontracepcija
HLA-A	*31:01	Poveča tveganje za stranske učinke	Karbamazepin
HLA-B	*15:02	Poveča tveganje za stranske učinke	Karbamazepin Okskarbazepin Fenitoin Lamotrigin
	*15:11		Karbamazepin
	*57:01		Abakavir Flukloksacilin
	*58:01		Alopurinol
NUDT15	*2,*3,*6,*9	Zmanjšana aktivnost	6-Merkaptopurin Azatioprin Tiogvanin
SLCO1B1 #	*5,*15,*17	Zmanjšana aktivnost	Atorvastatin Simvastatin
TPMT #	*2,*3A,*3B,*3C	Zmanjšana aktivnost	6-Merkaptopurin Azatioprin Tiogvanin
UGT1A1 #	*6,*27,*28,*37	Zmanjšana aktivnost	Irinotekan
VKORC1	-1639G>A, 1173 C>T	Zmanjšana aktivnost	Acenokumarol Fenprokumon Varfarin

CYP, citokrom P450; DPYD, dihidropirimidin dehidrogenaza; F5, faktor V Leiden; HLA, humani levkocitni antigen; NUDT, nudiks hidrolaza; SLCO, prenašalec organskih anionov; UGT, UDP-glukuronil transferaza; TPMT, tiopurin S-metil transferaza; VKORC, vitamin K epoksid reduktazni kompleks; geni označeni z # so vključeni v panel farmakogenetskih preiskav, ki jih ponuja spletni ponudnik 23andMe.

4. FARMAKOGENETSKI TESTI - TESTIRANJE PREK SPLETA

Diagnostični testi so bili v preteklosti zgolj v domeni zdravstvene dejavnosti, se pravi zdravnikov in laboratorijskih delavcev, v zadnjem desetletju pa sta se zelo razširila t. i. samotestiranje in testiranje prek spleta ("direct-to-consumer testing"), kjer je interpretacija rezultatov testa (v primeru samotestiranja pa tudi njegova izvedba) bolj kot ne prepuščena laičnemu uporabniku. Prednost tovrstnega testiranja je hiter in enostaven dostop do informacij o lastnem zdravstvenem stanju. Po drugi strani pa za

uporabnika nosi tudi potencialne nevarnosti, kot so sprejemanje odločitev o zdravljenju in preprečevanju bolezni na osnovi napačne ali nepopolne interpretacije rezultatov diagnostičnih testov.

4.1. Primer spletnega ponudnika farmakogenetskega testiranja (23andMe)

Podjetje 23andMe je na tržišču najdlje prisoten ponudnik farmakogenetskega testiranja prek spleta in ponuja tudi najširšo paleto farmakogenetskih testov, čeprav se je po letu 2013 njihov nabor testov zmanjšal zaradi kritik FDA (8). Glavna kritika stroke glede farmakogenetskega testiranja prek spleta temelji na odsotnosti strokovnjakov pri svetovanju in razlagi rezultatov testiranja, poleg tega se kriteriji za vključitev polimorfizmov in genov v testni panel pri spletnih ponudnikih razlikujejo od vključitvenih kriterijev DPWG, CPIC in FDA. 23andMe na primer smatra polimorfizme kot klinično relevantne, če vsaj trije znanstveni članki potrdijo povezavo med polimorfizmom in odzivom na zdravila. To lahko privede do diagnostične uporabe polimorfizmov, ki jih DPWG, CPIC in FDA ne obravnavajo kot klinično relevantnih, kar lahko vodi v napačne odločitve bolnika glede zdravljenja in nepotrebno zaskrbljenost (8). Po drugi strani pa spletni ponudniki testiranja pogosto ne vključujejo v svoje testne panele polimorfizmov, ki so po DPWG, CPIC in FDA opredeljeni kot klinično relevantnih, kar ravno tako vodi do zavajajočih rezultatov. Pogosto spletni ponudniki ne upoštevajo etnične pripadnosti preiskovanca kot tudi dejstva, da se lahko pogostost in s tem relevantnost nekega polimorfizma razlikuje med različnimi populacijami, kar nadalje otežuje interpretacijo rezultatov (8). Zaradi vsega tega je bila 23andMe po strogi kritiki FDA prisiljena omejiti obseg ponujenih farmakogenetskih testov. Oktobra 2018 je FDA podjetju 23andMe dala odobritev za izvajanje farmakogenetskih testov, ki obsegajo 33 polimorfizmov v osmih genih (označeni z # v Preglednici 1). Kljub odobritvi pa FDA opozarja, da se na osnovi rezultatov omenjenih testov ne sme spreminjati terapije in da morajo biti rezultati spletnega testiranja potrjeni v kliničnem laboratoriju, preden jih uporabimo kot podlago za spreminjanje ali uvajanje terapije (9).

4.2. Posledice spletnega farmakogenetskega testiranja za bolnika

Glavna skrb strokovne javnosti glede farmakogenetskega testiranja prek spleta je bilo sprejemanje napačnih odločitev uporabnikov (bolnikov) glede terapije brez posveta z zdravstvenimi delavci. Študija iz leta 2017 je pokazala, da je med 961 uporabniki spletnega farmakogenetskega testiranja kar 91 % uporabnikov prejelo informacijo o odstopanju genotipa od divjega tipa (na vsaj enem testiranem lokusu). Kljub temu jih je na osnovi teh informacij samo 5,6 % spremenilo terapijo, bodisi v smislu prehoda na drugo zdravilo ali spremembe odmerka. Od teh, ki so spremenili terapijo na osnovi

rezultatov spletnega testiranja, se jih je kar 83 % prej posvetovalo z zdravnikom. Zaključimo lahko torej, da je manj kot 1 % uporabnikov spletnega farmakogenetskega testiranja pridobljene rezultate uporabil za spremembo terapije brez odobritve zdravnika (10).

Študija iz leta 2018 je primerjala izkušnjo farmakogenetskega testiranja med uporabniki tovrstnega testiranja v kliničnem laboratoriju in prek spleta. Večina uporabnikov iz obeh podskupin (87,5 %) je izkušnjo testiranja opisala kot pozitivno in koristno. 40 % uporabnikov v obeh skupinah je bilo zaskrbljenih zaradi zasebnosti in varovanja podatkov. Razlike med skupinama pa so se pokazale v samopercepciji razumevanja rezultatov testiranja, in sicer je več kot 77 % uporabnikov kliničnih laboratorijev izjavilo, da so popolnoma razumeli rezultate testiranja, in samo 51,5 % uporabnikov testiranja na daljavo (11).

4.3. Vloga lekarniških farmacevtov pri farmakogenetskem testiranju prek spleta

Ker so lekarniški farmacevti javnosti lahko dostopni zdravstveni delavci, je pričakovano, da se bo s povečanjem pogostosti spletnega farmakogenetskega testiranja za interpretacijo rezultatov omenjenih testov nanje obrnilo vedno več posameznikov. Čeprav so raziskave pokazale, da imajo lekarniški farmacevti večinoma pozitiven odnos do farmakogenetskega testiranja, pa se jih večina ne čuti kompetentnih za interpretacijo rezultatov tovrstnega testiranja. Zato je treba poskrbeti za ustrezno izobraževanje na tem področju tako za bodoče lekarniške farmacevte kot tudi za tiste, ki so že aktivni (7).

Pri vključitvi lekarniških farmacevtov v farmakogenetsko svetovanje je treba upoštevati naslednje smernice in dejstva (9):

- Rezultati spletnega farmakogenetskega testiranja niso podlaga za spreminjanje obstoječe terapije. Omenjene rezultate mora potrditi medicinski laboratorij, preden se jih uporabi kot podlago za odločitve o spremembi/ uvedbi terapije.
- Relevantne smernice za klinično uporabo farmakogenetskih markerjev so dostopne na spletni strani CPIC (2).
- Genotip divjega tipa ne zagotavlja, da bo imel bolnik normalen metabolizem določenega zdravila, saj večina farmakogenetskih testov ne vključuje zelo redkih in še neodkritih mutacij.
- Različne mutacije v določenem farmakogenu niso enako klinično relevantne. Nekatere mutacije vplivajo na odziv na zdravilo, druge pa ne, kar je opredeljeno v smernicah CPIC.
- Če bolnik dobro prenaša že obstoječo terapijo, ni nujno, da terapijo spreminjamo zaradi rezultatov farmakogenetskega testiranja.
- Poleg genetskih dejavnikov na bolnikov odziv na zdravilo vplivajo tudi interakcije med zdravili, hrana, mikrobiom in drugi okoljski dejavniki.

- Rezultati farmakogenetskih testov niso magična rešitev, nam pa lahko pomagajo pri izbiri ustreznega zdravila in odmerka, kar posledično poveča verjetnost uspešnega izida zdravljenja že v prvem poskusu.

Rezultati farmakogenetskega testiranja imajo doživljenjsko uporabnost za bolnika in bi morali biti zabeleženi v njegovem zdravstvenem kartonu in/ali na kartici, pri čemer bi morali biti visoko rizični genotipi posebej označeni.

5. ZAKLJUČEK

Pričakujemo lahko, da bo v prihodnjem desetletju farmakogenetsko testiranje postalo običajna praksa na primarnem nivoju zdravstva, kar bo omogočalo večjo učinkovitost in varnost zdravljenja z zdravili. Veliko vlogo pri postavitvi in vzdrževanju tega sistema bodo imeli multidisciplinarni timi zdravnikov, farmacevtov, laboratorijskih delavcev in kliničnih genetikov. V prihodnosti ne bodo imeli lekarniški farmacevti pomembne vloge samo pri interpretaciji in uporabi rezultatov farmakogenetskih testov za usmerjanje terapije, temveč bodo tudi pomemben vmesni člen med uporabniki in ponudniki farmakogenetskih testiranj prek spleta. Za zagotovavljanje kompetentnost lekarniških farmacevtov v teh vlogah, bo treba v študijske programe farmacije uvesti več obveznih vsebin farmakogenetike ter organizirati redna izobraževanja in tečaje na to temo za delovno aktivne farmacevte.

LITERATURA

1. Pirmohamed M. Pharmacogenetics: past, present and future. *Drug Discov Today* 2011; 16 (19-20): 852-61.
2. Pirmohamed M. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 52 (4): 345-7.
3. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, and Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350 (21): 2129-39.
4. CPIC. CPIC guidelines. 30.04.2021; Available from: <https://cpicpgx.org/guidelines/>.
5. van der Wouden CH, van Rhenen MH, Jama WOM, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM, Konta L, Schwab M, Swen JJ, and Guchelaar HJ. Development of the PGx-Passport: A Panel of Actionable Germline Genetic Variants for Pre-Emptive Pharmacogenetic Testing. *Clin Pharmacol Ther* 2019; 106 (4): 866-873.
6. (PharmGKB) PKB. 30.4.2021; Available from: <https://www.pharmgkb.org/>.
7. Petry N, Baye J, Aifaoui A, Wilke RA, Lupu RA, Savageau J, Gapp B, Massmann A, Hahn D, Hajek C, and Schultz A. Implementation of wide-scale pharmacogenetic testing in primary care. *Pharmacogenomics* 2019; 20 (12): 903-913.
8. Lu M, Lewis CM, and Traylor M. Pharmacogenetic testing through the direct-to-consumer genetic testing company 23andMe. *BMC Med Genomics* 2017; 10 (1): 47.
9. Gammal RS, Mayes J, and Caudle KE. Ready or not, here it comes: Direct-to-consumer pharmacogenomic testing and its implications for community pharmacists. *J Am Pharm Assoc (2003)* 2019; 59 (5): 646-650.
10. Carere DA, VanderWeele TJ, Vassy JL, van der Wouden CH, Roberts JS, Kraft P, and Green RC. Prescription medication changes following direct-to-consumer personal genomic testing: findings from the Impact of Personal Genomics (PGen) Study. *Genet Med* 2017; 19 (5): 537-545.
11. Lemke AA, Hulick PJ, Wake DT, Wang C, Sereika AW, Yu KD, Glaser NS, and Dunnenberger HM. Patient perspectives following pharmacogenomics results disclosure in an integrated health system. *Pharmacogenomics* 2018; 19 (4): 321-331

