



**REPUBLIKA SLOVENIJA**  
**MINISTRSTVO ZA ZDRAVJE**

**RAZŠIRJENI STROKOVNI KOLEGIJ ZA**  
**LABORATORIJSKO DIAGNOSTIKO**

Naslov: Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo  
Univerzitetni klinični center Ljubljana  
Njogoševa 4, 1525 LJUBLJANA  
T: + 386 1 432 51 31  
F: + 386 1 432 51 31

PRESEDNICA:	dr. Pika Meško-Brguljan, univ.dipl.kem.	pika.mesko@klinika-golnik.si
PODPRESEDNICA:	izr.prof.dr. Janja Marc, mag.farm.	janja.marc@ffa.uni-lj.si
ČLANI:	prof.dr. Jana Lukač-Bajalo, univ.dipl.kem.	jana.bajalo@ffa.uni-lj.si
	izr.prof.dr. Borut Božič, mag.farm.	borut.bozic@ffa.uni-lj.si
	mag. Saša Bratož, mag.farm.	sasa.bratoz@kclj.si
	mag. Maksimiljan Gorenjak, mag.farm.	gormax@sb-mb.si
	Mojca Kozmelj, univ.dipl.kem.	mojca.kozmelj@zd-celje.si
	prof.dr. Joško Osredkar, mag.farm., višji svetnik	josko.osredkar@kclj.si
	asis.dr. Marija Prezelj, univ.dipl.kem.	marija.prezelj@kclj.si
ZAPISNIKAR:	Mojca Brenčič, strokovna sodelavka	mojca.brencic@kclj.si

---

Št.: RSK - 20/2008  
Ljubljana, 23. april 2008

**REPUBLIKA SLOVENIJA**  
**MINISTRSTVO ZA ZDRAVJE**  
Štefanova 5, 1000 Ljubljana

**Generalni direktor Direktorata**  
**za zdravstveno varstvo**  
**Prim. Janez Remškar, dr.med.**

**Strokovna presoja laboratorijskih izvidov in preverjanje referenc**  
**laboratorijev**

Avtizem je multifaktorska nevrološka motnja, ki nastane zaradi vpliva več dejavnikov in se kaže v obliki spektra znakov, zastoja v razvoju živčevja, še posebej na področjih, kot so kognitivne funkcije, socialne veščine ter repetitivno in ritualistično vedenje, v nekaterih primerih pa tudi vedenje, ki vodi do samopoškodovanja.

**Pri avtizmu običajno zasledimo naslednje prekrivajoče nenormalnosti:**

- oksidativni stres,
- zmanjšana možnost demetilacije in omejena transulfuracija,
- povečana obremenjenost s težkimi kovinami, predvsem živim srebrom,

- imunološke motnje z aktivacijo glialnih celic v možganih in
- premajhna prekrvavitev centralnega živčnega sistema.

Zaradi narave biokemičnih in biomedicinskih motenj pri otrocih z avtizmom moramo opraviti določene preiskave, da bi lahko ustrezno načrtovali terapijo. S pomočjo dobljenih rezultatov izberemo biomedicinske ukrepe, ki so individualno prilagojeni vsakemu posameznemu otroku.

### **Za opredelitev teh nenormalnosti lahko uporabimo naslednje laboratorijske parametre:**

- Metabolični profil: elektroliti, jetrni testi, testi za opredelitev ledvične funkcije (NAG), določitev testosterona.
- Imunološki markerji v krvi in urinu: neopterin biopterin, IgG, IgM, IgA in IgE, anti-endotheljska protitelesa, N-metilhistamin v urinu,
- Markerji oksidativnega stresa v krvi in urinu: reduciran in oksidiran glutation, antioksidantni proteini (transferin in ceruloplazmin), amoniak in laktat ter 8-OHdG in izoprostan v urinu,
- Težke kovine v krvi in markerji v urinu: Hg, Pb, As, Cd, Zn, Se, ter frakcionacija porfirinov v urinu. V določenih primerih so potrebni provokacijski testi in izplavljanje,
- Zmanjšana metilacija in omejena transulfuracija: cistin in metionin,
- Intestinalna permeabilnost: nenormalna absorbcija laktoze in manitola, lahko pa se uporabi tudi neinvaziven dihalni test,
- Organske kisline v urinu,
- Oksalati,
- Blato na bakterije in parazite ter Candido.

### **V Sloveniji se po naročilu pediatra naročajo naslednje preiskave:**

1. Težke kovine (Hg, Cu, Pb, Zn, Al),
2. Porfirini v urinu,
3. Blato na bakterije, parazite in Candido,
4. Peptidi v urinu,
5. Organske kisline in aminokisline
6. Genetske preiskave.

#### **Ad1. Težke kovine**

Težke kovine so povzročitelji odpovedi celičnega antioksidacijskega sistema, ki je zelo pomemben dejavnik pri nastanku avtizma. Cel spekter toksičnih elementov obsega približno 20 elementov, katerim smo izpostavljeni: Al, As, Be, Cd, Pb, Hg, U, Th, Tl, Ni in Sn. Pomembno pa je izmeriti tudi prehranske minerale vključno z Mg, Zn, Mn, Fe, Co, Se, P in S.

Mnogi od njih so pomembni za normalno delovanje antioksidantnega sistema.

Težke kovine se določajo z metodo atomske absorpcije (EAS) na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo. Vse določitve se izvajajo po priporočenih postopkih z uporabo ustreznih standardov in kontrolnih materialov. KIKKB je vključen v nacionalno in mednarodno kontrolo rezultatov. Za vse te analize laboratorij predloži ustrezne certifikate. KIKKB je pri Ministrstvu za zdravje v postopku pridobitve dovoljenja za delo. V primeru kakršnihkoli problemov je možno te analize ponoviti na Inštitutu Jožef Stefan z IPC-MS metodo, ki je referenčna metoda za določanje kovin.

Vse te določitve se izvajajo v krvi. Zahtev, da bi se te kovine določale tudi v drugih bioloških vzorcih (lasje, urin, blato) s strani klinike ni bilo.

Starši nekaterih avtističnih otrok so poslali vzorce las v Doctor's Data, Inc. Laboratorij – Illinois, USA. DDL ima CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) certifikat tersodeluje v več shemah za zagotavljanje kontrole kvalitete, med drugim tudi v CAP (College of American Pathology) programu.

Analize v DDL so narejene z IPC-MS metodo in so popolnoma ustrezne (odlične).

**Mnenje – 1: V Sloveniji zagotavljamo ustrezne analize težkih kovin v krvi. Če bo klinika dala naročilo za določitev težkih kovin v drugih bioloških vzorcih, jih lahko izvedemo.**

### **Ad2. Celotni porfirini**

Celotni porfirini se določajo na KIKKB. Za določitev posameznih frakcij je sedaj na KIKKB v nabavi fluorescenčni detektor, ki omogoča detekcijo posameznih frakcij (Uroporfirin, 7-Koproporfirin, 6- Koproporfirin, 5- Koproporfirin, 4- Koproporfirin I in III), ki naj bi bile pomembne pri obremenjenosti organizma s Hg oziroma Pb. V zvezi z zastrupitvami s Hg je še kar precej nejasnosti, oziroma nerešenih vprašanj, zato so rezultati posameznih frakcij včasih vprašljivi.

Starši nekaterih avtističnih otrok so poslali vzorce urina v Laboratoire Philippe Auguste (LPA) v Pariz. Laboratorij ima ustrezne certifikate in je vključen v mednarodne sheme, so pa rezultati, ki jih izdajajo vprašljivi zaradi:

- priprava urinskih vzorcev za analizo porfirinov ne eliminira interferenc, ki se potem v rezultatu pojavijo kot prekoprofirin,
- v LPA uporabljajo referenčne vrednosti za koproporfirine, ki se ne ujemajo s starostjo analiziranih vzorcev otrok,
- LPA ni dokazal, da je prekoprofirin res prekoprofirin, oziroma ali je to ena kemijska entiteta,
- Nataf (vodja laboratorija) je v svojem članku leta 2006 objavil drugačne referenčne vrednosti kot jih uporablja LPA.

V kromatogramu se med pentakarboksiporfirinom in koproporfirinom I se pojavi pik – prekoprofirin, ki je povišan v primeru zastrupitev s Hg oziroma Pb. V tej frakciji se lahko skriva mnogo porfirinov (hidroksikoproporfirin, hidroksiizokoproporfirin, ketoizokoproporfirin, formilkoproporfirin in beta-ketopropionska kislina pentakarboksilporfirin). Ker so beta-ketokislina zmožne tvoriti stabilne intramolekularne vodikove vezi, pride do nastanka bolj hidrofobnih oblik in posledično daljšega retenzijskega časa. Vedno je nevarno predpostaviti da se med penta in kopro eluira ketoizokopro, ker je glede na sam HPLC sistem lahko prisotno karkoli od zgoraj navedenih. V frakciji prekoprofirina se lahko skriva vitamin, zdravila ali pa kakšna kemikalija iz okolja. Vsaka snov, ki fluorescira se lahko koeluira in daje lažno zvišane rezultate.

Analize narejene v Great Plains Laboratory, Inc. (11813 West 77th, Lenexa, KS 66214) teh pomanjkljivosti nimajo, dobre rezultate pa je moč dobiti tudi v Recipe Chemical + Instruments Labortechnik (Munchen), ki pa je predvsem kalibracijski laboratorij.

**Mnenje - 2: Trenutno v Sloveniji določamo celotne porfirine, v kratkem bo KIKKB ponudil tudi posamezne frakcije. Do takrat je primeren laboratorij Great Plains Laboratory.**

### **Ad3: Blato na bakterije, parazite in Candido**

Ob izpostavljenosti toksičnim mineralom pride do nenormalne bakterijske kolonizacije črevesja, pri čemer lahko opazimo nezadostno količino koristnih bakterij, veliko količino

potencialno patogenih bakterij ali pa mešanico obeh oblik. Zelo pogosto je prisotna kvasovka, *Candida albicans*.

To neravnovesje je pomembno zato, ker koristne bakterije iz otrokove hrane jemljejo hranila, ki jih telo ne potrebuje, nazaj pa sproščajo mnoge koristne snovi (vitamine B in vitamin K), koristne bakterije pa pomagajo pri razgradnji aminokislin in sladkorjev.

Potencialno patogene bakterije porabljajo hranilne snovi, ki jih telo potrebuje, hkrati pa sproščajo toksine, ki lahko okvarijo črevesni imunski sistem in celično imunost, kar lahko vodi do avtoimunosti. Toksini, ki jih izloča kandida pa prehajajo krvno-možgansko bariero in vplivajo na kognitivne funkcije.

Koprokultura se izvaja na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani in v regionalnih Zavodih za zdravstveno varstvo.

Glede na to, kakšno naročilo dobijo, podajo rezultat. V glavnem normalne flore ne podajajo, pač pa samo patološko.

Starši nekaterih otrok z avtizmom so vzorce blata poslali na analizo v Doctor's data, Inc. Ta laboratorij poda rezultate flore v treh sferah: dobre (beneficial), motene (imbalance) in patološke (dysbiotic flora).

Tako podani rezultati kliniku dajo ustrezno informacijo za nadaljno obravnavo bolnika (ustrezna dieta, antibiotična ali kaka druga terapija).

**Mnenje – 3: Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo MF v Ljubljani je ob primernem naročilu usposobljen podajati rezultate v taki obliki kot jih podaja DDL (Kontakt Alenka Andlovic, dr.med.).**

#### **Ad4. Peptidi v urinu**

Analiza peptidov kaže na to, pri katerem otroku bo v največji meri koristila usmerjena dieta – brez glutenska in brez kazeinska. V nekaterih primerih je potrebno uvesti še bolj striktno dieto, ki jo poimenujemo specifična ogljikohidratna dieta, ker gre za zmanjšanje ali sploh preprečitev vnosa glukoze in fruktoze.

V okviru projekta, ki ga financira ARRS smo postavili metodo za določanje peptidov v urinu. (Razvili smo metodo za določanje peptidov v urinu, ki obsega posamezne analitske postopke: čiščenje vzorca, izolacija peptidov z ekstrakcijo na trdnem adsorbentu (solid phase extraction-SPE) z Oasis HLB adsorbentom (Waters, Milford, USA), detekcijo, identifikacijo ter kvantifikacijo peptidov s tekočinsko kromatografijo v povezavi z masno spektrometrijo (LC-MS). S standardno zmesjo peptidov (Alfa casein, Morphiceptin, Beta casomorphin human, Leucin-enkephalin in IAG-indolyl-3-Acryloglycin) smo optimizirali parametre adsorpcije in desorpcije spojin na trdnem adsorbentu, izbiro topil, pogoje separacije spojin s tekočinsko kromatografijo in instrumentalne parametre detekcije posameznih spojin z masnim spektrometrom).

Metoda je validirana, vendar je trenutno le kot »raziskovalna« metoda. Poimenovanje v navednicah sem uporabil zato, ker smo jo v okviru projekta postavili na IJS, ki je zgolj raziskovalna inštitucija, kjer nimajo izkušenj z organizacijo dnevnega rutinskega dela za paciente. Rezultati bodo normalno dosegljivi klinikom, ko bo ta metoda postavljena v klinični laboratorij.

Starši nekaterih avtističnih otrok so vzorce urina za določitev peptidov poslali na Norveško k dr. Reicheltu. (Pediatric Research Institute, N-0027 Oslo, Norway). Skupaj z urinom je potrebno poslati rezultate določitev protiteles proti gliadinu in kazeinu. Rezultati, ki jih dr. K. Reichelt pošilja so podani na način, da jih je zelo težko interpretirati.

**Mnenje – 4: Trenutno priporočilo je, da se vzorci urina pošiljajo v Oslo. Potrebno bo najti možnosti, da se bodo te analize začele izvajati v kliničnem laboratoriju (oprema).**

#### **Ad5. Organske kisline in aminokisline**

S preiskavo organskih kislin ugotavljamo presnovne posledice prirojenih presnovnih »blokad«. Presnovne blokade nastanejo zato, ker je bil otrok rojen s pomanjkljivostmi določenih encimskih sistemov, ki ne dovoljujejo pravilne razgradnje odpadnih snovi v telesnih celicah. S to analizo lahko ugotovimo 45 presnovnih napak na naslednjih področjih:

- presnova maščobnih kislin,
- celična proizvodnja energije,
- celična detoksifikacija,
- antioksidantna funkcija,
- oksidativni stres,
- sinteza nevrotransmiterjev,
- metilacija,
- sinteza bakterijskih toksinov.

Rezultati testov običajno kažejo na motnje na dveh do treh področjih, včasih pa tudi na vseh. Na Pediatrični kliniki UKC – Ljubljana imajo opremo za določanje organskih kislin in aminokislin. Od organskih kislin določajo le kratkoverižne organske kisline.

Starši avtističnih otrok so vzorce urina za določitev organskih kislin pošiljali v več laboratorijev: Metamatrix, Clinical laboratory (3425 Corporate Way, Duluth, GA 30096), Great Plains Laboratory, Laboratoire Philippe Auguste in Genova Diagnostics.

Vsi omenjeni laboratoriji imajo ustrezne certifikate in sodelujejo v mednarodnih shemah za zagotavljanje kakovosti rezultatov.

**Mnenje – 5: Priporočam uporabo Metamatrix laboratorija, ki daje najpopolnejšo analizo na osnovi katere je možno, da klinik uvede primerno dieto.**

#### **Ad – 6: Genetske preiskave**

Pri avtistični otrocih imamo lahko gensko pogojene encimske napake, še posebej neustrezno ekspresijo genov, ki kodirajo naslednje encime:

- COMT – katehol-orto metil transferaza,
- CBS – cistatin beta sintetaza,
- MS – metionin sintetaza,
- MTHFR – metil-tetrahidrofolat reduktaza,
- MAOA – monoamin-oksidge aldolaza.

Genetske preiskave zaradi visoke cene ni potrebno opraviti v vseh primerih. Z njimi ugotavljamo dejanske delecije genov ali genske šibke točke oziroma motnje. Podobne informacije lahko dobimo z analizo organskih kislin, ki nam da še veliko dodatnih podatkov o drugih presnovnih blokadah.

**Mnenje – 6: Metodologija in rezultati genskih preiskav v primerih ko so narejene na Pediatrični kliniki UKC Ljubljana ustreza.**

#### **Povzetek aktivnosti v zadnjem obdobju**

Zaradi zelo pereče problematike na področju zdravstvene obravnave avtističnih otrok, je bilo posebno v letošnjem letu več sestankov:

- 9. januar 2008 – v Državnem zboru – sestanek s predstavniki društev, Ministrstvom za zdravje, Ministrstvom za delo, družino in socialne zadeve in Ministrstvom za šolstvo in šport;
- 13. februar 2008 na Ministrstvu za zdravje – sestanek predstavništev društev, Pediatrične klinike in Zdravniškega društva;

- 15. februar 2008 – na Ministrstvu za zdravje – sestanek povabljenih strokovnjakov z državnim sekretarjem.

Zaključek vseh sestankov je bil, da dokler v Sloveniji ne vzpostavimo možnosti primerne obravnave bolnikov, pošiljamo vzorce otrok v izbrane laboratorije v tujino (glede na navedbe v zgornjih 6 točkah), Ministrstvo za zdravje pa nadaljuje aktivnosti, da bo nov zdravstveni program »Celostna obravnava otrok in mladostnikov s spektroavtističnimi motnjami« vključen v Splošni dogovor za pogodbeno leto 2008. Predlog društva DAN, da se pridobi vsaj enega zdravnika, ki bo s srcem delal na tem področju in se strokovno izpopolnjeval ter spremljal napredek otrok, je dober in je zato potrebno najti možnosti, da se ga tudi realizira.

**POVZETEK:**

**Mnenje – 1: V Sloveniji zagotavljamo ustrezne analize težkih kovin v krvi. Če bo klinika dala naročilo za določitev težkih kovin v drugih bioloških vzorcih, jih lahko izvedemo.**

**Mnenje - 2: Trenutno v Sloveniji določamo celotne porfirine, v kratkem bo KIKKB ponudil tudi posamezne frakcije. Do takrat je primeren laboratorij Great Plains Laboratory.**

**Mnenje – 3: Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo MF v Ljubljani je ob primernem naročilu usposobljen podajati rezultate v taki obliki kot jih podaja DDL (Kontakt Alenka Andlovic, dr.med.).**

**Mnenje – 4: Trenutno priporočilo je, da se vzorci urina pošiljajo v Oslo. Potrebno bo najti možnosti, da se bodo te analize začele izvajati v kliničnem laboratoriju (oprema).**

**Mnenje – 5: Priporočam uporabo Metamatrix laboratorija, ki daje najpopolnejšo analizo na osnovi katere je možno, da klinik uvede primerno dieto.**

**Mnenje – 6: Metodologija in rezultati genskih preiskav v primerih ko so narejene na Pediatrični kliniki UKC Ljubljana ustreza.**

**Sklep – 1: Ministrstvo za zdravje nadaljuje aktivnosti, da bo nov zdravstveni program »Celostna obravnava otrok in mladostnikov s spektroavtističnimi motnjami« vključen v Splošni dogovor za pogodbeno leto 2008.**

**Predlog – 1: Pridobiti vsaj 1 zdravnika, ki bo s srcem delal na tem področju, se strokovno izpopolnjeval in spremljal napredek otrok. Strokovno izpopolnjevanje pomeni to, da bo predvsem vedel, kakšno diagnostiko (laboratorijsko) ima na razpolago in seveda znal interpretirati rezultate naročenih laboratorijskih analiz.**

Pripravil:

Prof.dr. Joško Osredkar, mag. farm., višji svetnik

PRESEDNICA RSK:

Dr. Pika Meško Brguljan, spec.med.biokem.,l.r.