

01-2022/v.1.

Nacionalne smjernice za izradu testa klorida u znoju za dijagnozu cistične fibroze Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu i Centra za cističnu fibrozu djece i odraslih, Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Jasna Leniček Krleža, Merica Aralica, Duška Tješić Drinković, Karolina Crneković, Jelena Culej, Gordana Fressl Juroš, Verica Horvat, Dara Metzner, Dijana Pamuković Jaram, Alma Pipić Kitter, Fran Smaić, Sanela Šimić Vojak, Livija Šimičević, Valentina Verić

Zagreb, veljača 2022.

Naslov:

Nacionalne smjernice za izradu testa klorida u znoju za dijagnozu cistične fibroze Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu i Centra za cističnu fibrozu djece i odraslih, Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Autori:

Jasna Leniček Krleža, Merica Aralica, Duška Tješić Drinković, Karolina Crneković, Jelena Culej, Gordana Fressl Juroš, Verica Horvat, Dara Metzner, Dijana Pamuković Jaram, Alma Pipić Kitter, Fran Smaić, Sanela Šimić Vojak, Livija Šimičević, Valentina Verić

Izdavač:

Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM)

Prijevod:

Jasna Leniček Krleža, Merica Aralica, Dara Metzner, Fran Smaić

Ovaj dokument je prijevod članka objavljenog u časopisu Biochemia Medica: National Guidelines for the Performance of the Sweat Test in Diagnosis of Cystic Fibrosis on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine and the Cystic Fibrosis Centre - Paediatrics and adults, University Hospital Centre Zagreb (Zagreb) 2022;32(1):010501.

Korektura:

Jasna Leniček Krleža, Merica Aralica

Grafičko oblikovanje:

Maja Mravec, Braće Radića 107, Mraclin

ISBN: 978-953-96611-5-9

Nacionalne smjernice za izradu testa klorida u znoju za dijagnozu cistične fibroze Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu i Centra za cističnu fibrozu djece i odraslih, Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Jasna Leniček Krleža

Zavod za laboratorijsku dijagnostiku,
Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zagreb

Merica Aralica

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku,
Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka

Duška Tješić Drinković

Cetar za cističnu fibrozu djece i odraslih,
Klinički bolnički centar Zagreb i Medicinski
fakultet, Sveučilišta u Zagrebu

Karolina Crneković

Odjel za laboratorijsku dijagnostiku,
Opća bolnica „Dr. Ivo Pedišić“, Sisak

Jelena Culej

Poliklinika Breyer, Zagreb

Gordana Fressl Juroš

Odjel za kliničko-laboratorijsku
dijagnostiku, Dječja bolnica Srebrnjak, Zagreb

Verica Horvat

Medicinsko-biokemijski laboratorij,
Opća bolnica Varaždin, Varaždin

Dara Metzner

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku,
Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka

Dijana Pamuković Jaram

Odjel biokemijsko-hematološkog laboratorija,
Opća bolnica Šibenik, Šibenik

Alma Pipić Kitter

Odjel za laboratorijsku dijagnostiku, Opća
bolnica „Dr. Josip Benčević“, Slavonski Brod

Fran Smaić

Odjel za laboratorijsku dijagnostiku, Opća
bolnica „Dr. Josip Benčević“, Slavonski Brod

Sanela Šimić Vojak

Odjel za hematološko-biokemijsku dijagnostiku,
Opća županijska bolnica Požega, Požega

Livija Šimičević

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku,
Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Valentina Verić

Medicinsko-biokemijski laboratorij,
Opća bolnica Bjelovar, Bjelovar

SADRŽAJ

SAŽETAK	3
UVOD	4
Cistična fibroza	4
Test kloridi u znoju	5
SMJERNICE ZA IZRADU TESTA KLORIDA U ZNOJU	6
Međunarodne smjernice za izradu testa klorida u znoju	6
Nacionalne smjernice za izradu testa klorida u znoju	6
Područje primjene nacionalnih smjernica za izradu testa klorida u znoju	6
Cilj nacionalnih smjernica za izradu testa klorida u znoju	6
RADNA GRUPA ZA STANDARDIZACIJU TESTA KLORIDA U ZNOJU I POSTUPAK IZRADE NACIONALNIH SMJERNICA	7
FINANCIJSKE POSLJEDICE STANDARDIZACIJE TESTA KLORIDA U ZNOJU	8
SADRŽAJ SMJERNICA	8
Novorođenački probir na cističnu fibrozu i test klorida u znoju	8
Indikacije za test klorida u znoju	8
Informiranje pacijenta i roditelja/skrbnika o testu klorida u znoju	9
Pripremljenost pacijenta za test klorida u znoju	9
Izrada testa klorida u znoju	9
Mjesta za izradu pilokarpinske iontoforeze.....	9
Pilokarpinska iontoforeza	9
Stabilnost uzorka	10
Analiza znoja.....	11
Kontrola kvalitete	11
Referentni intervali i tumačenje rezultata	12
Sadržaj i izgled nalaza	13
Odgovornost za edukaciju i testiranje	13
NADZOR NAD PRIMJENOM NACIONALNIH SMJERNICA U MEDICINSKO-BIOKEMIJSKIM LABORATORIJIMA ...	13
PREGLED I NADOPUNA PRVOG IZDANJA	13
ZAHVALA	14
LITERATURA	15
PRILOZI	17
Prilog 1. Dijagram izrade testa klorida u znoju.	17
Prilog 2. Pregled rezultata anketnog istraživanja o prijeanalitičkoj i analitičkoj fazi testa klorida u znoju	17
Prilog 3. Primjer informativnog letka o testu klorida u znoju	19
Prilog 4. Izračun minimalne mase znoja	20
Prilog 5. Popis indikatora kvalitete izrade testa klorida u znoju.....	21
Prilog 6. Popis mogućih razloga lažno pozitivnog i lažno negativnog rezultata testa klorida u znoju	21
Prilog 7. Popis kometara pristiglih na javnu raspravu i odgovor Radne grupe za standardizaciju testa klorida u znoju.....	22

SAŽETAK

Test klorida u znoju je pretraga koja uz novorođenački probir i gensko testiranje čini temelj za postavljanje dijagnoze cistične fibroze (CF). Kvaliteta izrade tog testa ovisi o vještini osoblja koje ga radi pa je zbog toga objavljeno nekoliko međunarodnih smjernica za standardizaciju njegove izrade, ali i dalje postoji neusklađenost u postupku provođenja ove pretrage. Radna grupa za standardizaciju testa klorida u znoju Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu u suradnji sa Centrom za cističnu fibrozu djece i odraslih, Kliničkog bolničkog centra Zagreb izdala je Nacionalne smjernice za izradu testa klorida u znoju za dijagnozu cistične fibroze s ciljem osiguranja dosljednosti u njegovoj izradi, točnosti rezultata i ujednačenosti izvještavanja nalaza. Velik dio preporuka preuzet je iz drugog izdanja britanskih

smjernica (*2nd Edition of the UK Guidelines for Performance of the Sweat Test for the Investigation of Cystic Fibrosis*). Ipak, jedan dio čine nezavisne preporuke radne grupe na temelju postojeće opreme i prakse izrade testa u Hrvatskoj. Preporuke se odnose na svaku fazu izrade te pretrage, od indikacija za testiranje do izvještavanja i tumačenja rezultata, uključujući analitičku fazu i kontrolu kvalitete. Nacionalne smjernice također uključuju priloge s praktičnim primjerima s ciljem olakšavanja primjene preporuka u rutinskom radu.

Ključne riječi: cistična fibroza, test klorida u znoju, pilokarpinska iontoforeza, analiza klorida u znoju, preporuke

UVOD

Cistična fibroza

Cistična fibroza (CF) je autosomno recesivna bolest koju uzrokuju dvije mutacije transmembranskog regulatora provodljivosti za cističnu fibrozu (engl. *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, CFTR). Taj gen kodira sintezu istoimenog proteina koji se nalazi na membranama većine epitelnih stanica u tijelu ljudi (1).

CFTR protein primarno regulira prienos elektrolita kroz staničnu membranu, a njegova široka rasprostranjenost u različitim tkivima objašnjava multisistemsku prirodu CF. Disfunkcija CFTR proteina dovodi do stvaranja i akumuliranja viskoznog sekreta u tkivima pa se CF prezentira kroničnom bolešću pluća, nedovoljnom apsorpcijom hranjivih tvari koju prati pothranjenost, muškom neplodnošću, sindromom gubitka soli, te najčešćim simptomom CF, a to je povećano izlučivanje soli u znoju (2). S vremenom, oboljeli od CF razvijaju komplikacije kao što su šećerna bolest, osteoporoza, i kronične bolesti jetre (3). Iako je CF monogenetska bolest, njena klinička prezentacija varira od pacijenta do pacijenta, čak i kod onih s istim genotipom pa se simptomi u jedne osobe mogu mijenjati tijekom bolesti (1).

CF se smatra najčešćom nasljednom bolesti u bijelaca s incidencijom od 0,25 do 5 na 10.000 živorođenih (4). Procijenjena prevalencija bolesti u Europskoj uniji iznosi 0,75 na 10.000 što CF ubraja u skupinu rijetkih bolesti (5). Ipak, ukupan broj oboljelih od CF je u porastu, zahvaljujući napretku dijagnostike i terapije, pa se u budućnosti očekuje da će broj odraslih nadmašiti broj djece (6). Prema objavljenim podacima Registra oboljelih Europskog društva za cističnu fibrozu (engl. *European Cystic Fibrosis Society*, ECFS), u Europi je 2018. godine

registrirano 49.886 oboljelih od CF, od čega su 51,2% odrasle osobe (7). Hrvatska je uključena u Registar oboljelih ECFS-a preko baze podataka oboljelih od CF, u kojoj su 2018. godine registrirana 132 pacijenta, od kojih je bilo 37% odraslih osoba. Demografski i epidemiološki podaci ukazuju da 12-14 novorođenih u jednoj godini ima CF (8,9).

Za dijagnozu CF postoji međunarodni konsenzus. Prve smjernice objavljene su 1988. godine pa je Hrvatsko društvo za pedijatrijsku gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu godine 2004. objavilo „*Postupnik za dijagnozu cistične fibroze*“ (2,10). Tijekom godina objavljene međunarodne smjernice bile su nadopunjavane prema novim spoznajama. Ipak, za sada se kao standard prihvaća američko-europski konsenzus Fondacije za cističnu fibrozu (objavljen 2017. godine) (11,12). Te smjernice zadržale su osnovno polazište da se kod pacijenta s kliničkim simptomima bolesti mora testirati funkcija CFTR proteina za potvrdu dijagnoze CF. Klinička sumnja znači da osoba ima barem jedan karakterističan simptom, pozitivan nalaz novorođenačkog probira na CF (za sada nije dostupan u Hrvatskoj), ili člana uže obitelji oboljelog od CF (2,13). Jedan od indikatora oštećene funkcije CFTR proteina je povišena koncentracija klorida u znoju, koja se određuje testom klorida u znoju koji se još naziva i znojni test (engl. *sweat test*) (12). To je, dakle, prvi i najvažniji laboratorijski test za potvrdu dijagnoze CF. Postoje još dva testa kojima je moguće procijeniti funkciju CFTR proteina, ali ona nisu široko prihvaćena. Jedan je *in vivo* određivanje razlike potencijala nosne sluznice, a drugi je *ex vivo* određivanje jakosti struje na stanicama sluznice crijeva. Dijagnoza CF može se potvrditi i genetičkim testiranjem, ali samo ako se utvrde dvije mutacije koje su povezane s CF (2). Više od polovice novodijagnosticiranih u Europi i svijetu je dijagnosticirano zahvaljujući novorođenačkom probiru (12). Ipak, kod neke dojen-

čadi s pozitivnim rezultatom novorođenačkog probira moguć je izostanak ostalih kriterija koji su potrebni za dijagnozu CF pa se takvi slučajevi opisuju kao CFMS/CFSPID (od engl. *CFTR-related metabolic syndrome/CF screen positive inconclusive diagnosis*) (14). S obzirom na to da se u Hrvatskoj ne provodi novorođenački probir za CF, njena dijagnoza ovisi isključivo o alertnosti liječnika da prepozna simptome bolesti, od najranije do odrasle dobi. Bez obzira na to postoji li probir ili ne, i bez obzira na to koliko se ekstenzivno provodi genetska analiza, glavna pretraga kojom se potvrđuje sumnja na bolest jest test klorida u znoju. Stoga su kvaliteta izrade i ispravno tumačenje njegovih rezultata ključne karike za pouzdanu potvrdu ili odbacivanje dijagnoze CF (12).

Test kloridi u znoju

Test klorida u znoju obuhvaća niz postupaka (od stimulacije znojenja, skupljanja znoja, određivanja koncentracije klorida u skupljenom znoju, do izdavanja i tumačenja nalaza) kojima se procjenjuje funkcija CFTR proteina u žlijezdama znojnicama djece i odraslih. Smatra se da nalaz klorida u znoju omogućuje detekciju CF kod više od 95% oboljelih, a prema novijim istraživanjima koncentracija klorida u znoju koristan je biljeg funkcije CFTR proteina u kliničkim ispitivanjima lijekova za CF (15,16).

Prijeanalitička faza izrade testa klorida u znoju obuhvaća pripremu pacijenta, stimulaciju znojenja postupkom pilokarpinske iontoforeze (PI) i skupljanje znoja. Stimulacija žlijezda znojnica provodi se primjenom slabe struje i pilokarpin nitrata u otopini (natopljen na filter papir/gazu) ili gelu na koži podlaktice ispitanika, nakon čega slijedi skupljanje znoja pomoću filter papira, gaze ili komercijalnog sustava koji sadrži plastični nosač s cjevčicom. Prije pojave komercijalnih sustava za PI, svi laboratoriji i pedijatrijske ambulante koristili su *in-house* opre-

mu i materijale koji su bili adaptirani prema metodi Gibson-Cooke (17,18). Jedan dio ustanova zadržao je takav način izrade PI (19).

Analitička faza pretrage obuhvaća određivanje koncentracije klorida nekom od validiranih metoda ili određivanje vodljivosti iona (klorida, bikarbonata, laktata) konduktometrijskom metodom u skupljenom znoju. Bez obzira na korištenu metodu, rezultat testiranja izražava se u mmol/L. Rezultat (izražen kao koncentracija) dobiven konduktometrijom uz kloride uključuje i druge ione iz znoja, te predstavlja onu množinsku koncentraciju otopine natrij klorida kod koje ta otopina ima jednaku provodljivost kao i znoj na istoj temperaturi (20). Prema važećim smjernicama, konduktometrija se može koristiti kao metoda probira, no nije prikladna za potvrdu dijagnoze CF (12, 21). Na tržištu su dostupni komercijalni sustavi za odvojenu izradu prijeanalitičke i analitičke faze, kao i sustav koji objedinjuje te dvije faze u jednom zajedničkom instrumentu kao što je *Nanoduct Neonatal Sweat Analysis System* (Nanoduct, ELI-TechGroup, USA). Nanoduct primjenjuje PI za stimuliranje znojenja i konduktometriju za neselektivno mjerenje vodljivosti iona u znoju (22). On se koristi u nekim zdravstvenim ustanovama u Hrvatskoj.

U poslijeanalitičkoj fazi tumačenje rezultata testa klorida u znoju ovisi o indikaciji za testiranje. Ona može biti u svrhu potvrde ili isključivanja CF, te za praćenje odgovora na terapiju CFTR modulatorima. U prilogu 1 nalazi se dijagram koji opisuje sve faze u izradi testa.

Glavni cilj Nacionalnih smjernica za izradu testa klorida u znoju u dijagnostici CF je standardizacija tog testa u zdravstvenim ustanovama u Hrvatskoj, osiguravanje kvalitetnog i ujednačenog postupka neovisno o mjestu njegove izrade, te točnost u izvještavanju rezultata i njihovom tumačenju.

SMJERNICE ZA IZRADU TESTA KLORIDA U ZNOJU

Međunarodne smjernice za izradu testa klorida u znoju

U Europi i svijetu publicirano je nekoliko nacionalnih smjernica za izradu testa klorida u znoju među kojima se ističu multidisciplinarnе britanske smjernice iz 2004. godine te njihova nadopunjena verzija iz 2014. godine (u daljnjem tekstu drugo izdanje britanskih smjernica), koje su pripremljene prema principima medicine temeljene na dokazima (20,21,23). Zajednički američko-europski konsenzus za dijagnozu CF podrazumijeva izvođenje testa klorida u znoju sukladno validiranim protokolima, čime se osigurava primjerena količina sakupljenog znoja i točnost rezultata (12).

Nacionalne smjernice za izradu testa klorida u znoju

Izrada nacionalnih smjernica za izradu testa klorida u znoju (u daljnjem tekstu nacionalne smjernice) nastavak je istraživanja koji je ukazao na potrebu standardizacije testa klorida u znoju na nacionalnoj razini, zbog nedosljednosti u njegovoj izradi u medicinsko-biokemijskim laboratorijima (MBL) u Hrvatskoj (19).

Područje primjene nacionalnih smjernica za izradu testa klorida u znoju

Nacionalne smjernice su primarno usmjerene prema laboratorijskom osoblju i drugom zdravstvenom osoblju koje je uključeno u izra-

du testa klorida u znoju neovisno o korištenoj metodi, a u svrhu njegove standardizacije u zdravstvenim ustanovama u Hrvatskoj. Također su namijenjene svim zdravstvenim djelatnicima, kao i pacijentima i roditeljima/skrbnicima koje zanimaju izrada i tumačenje te pretrage.

Cilj nacionalnih smjernica za izradu testa klorida u znoju

Nacionalne smjernice su fokusirane na standardizaciju izrade testa klorida u znoju u zdravstvenim ustanovama u Hrvatskoj. Standardizacija u prijeanalitičkoj fazi odnosi se na napuštanje korištenja *in-house* instrumenta, pribora, materijala i postupaka za PI koji su u suprotnosti sa sadržajem smjernica. U analitičkoj fazi smjernice su usmjerene na korištenje analitičkog instrumenta za određivanje koncentracije klorida u znoju validiranom metodom. Standardizacija u poslijeanalitičkoj fazi znači harmonizirano izvještavanje rezultata, kontinuiranu edukaciju, kontrolu kvalitete rada, i izdavanje nalaza. Postupak standardizacije testa klorida u znoju zahtjeva vrijeme, ali i potencijalno financijsko opterećenje zdravstvenih ustanova u kojima se radi ta pretraga. Ipak, usvajanje nacionalnih smjernica može poboljšati izradu testa klorida u znoju i u onim ustanovama koje odluče zadržati postojeću praksu korištenja *in-house* pribora i materijala. Primjenom nacionalnih smjernica u takvim ustanovama može se poboljšati izrada testa klorida u znoju do postizanja potpune standardizacije. Standardizirani test klorida u znoju je neophodan jer uklanja sustavnu pogrešku u svim fazama testiranja te osigurava kvalitetno određivanje koncentracije klorida u znoju u ciljanoj populaciji.

RADNA GRUPA ZA STANDARDIZACIJU TESTA KLORIDA U ZNOJU I POSTUPAK IZRADE NACIONALNIH SMJERNICA

Radna grupa za standardizaciju klorida u znoju (RG SKZ) osnovana je 2017. godine u suradnji s Povjerenstvom za znanstveno-stručni razvoj Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM) i Hrvatskog centra za vrednovanje kvalitete u laboratorijskoj medicini (engl. *Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine*, CROQALM), provoditeljem vanjske kontrole kvalitete u MBL u Hrvatskoj (24). Zbog interdisciplinarne prirode testa klorida u znoju u rad RG SKZ uključen je i specijalist za cističnu fibrozu iz Centra za cističnu fibrozu, Kliničkog bolničkog centra Zagreb. U vrijeme osnivanja RG u većini MBL (12/13) test klorida u znoju se radio *in-house* postupkom PI i određivanjem koncentracije klorida u eluatu sadržaja znoja merkurimetrijskom titracijom (MMT) prema mikrometodi Schales-Schales. Međusobna komunikacija članovarske grupe tijekom izrade smjernica odvijala se putem elektroničke pošte i na sastancima na daljinu (u daljnjem tekstu telekonferencija). Navedeni načini komunikacije služili su za definiranje ciljeva i zadataka te za donošenje konačnih odluka koje su zatim preuzete i objavljene kao preporuke u završnoj verziji dokumenta. Usvojena završna verzija poslana je elektroničkim putem na konzultacije stručnim društvima i udrugama.

Na prvoj telekonferenciji u studenome 2017. godine odlučeno je da se izrada nacionalnih smjernica za standardizaciju testa klorida u znoju temelji na sadržaju drugog izdanja britanskih smjernica za izradu testa klorida u znoju za dijagnozu cistične fibroze zbog njihove visoke kvalitete (21). Od kontakt osobe iz britanske multidisciplinarnе radne grupe 2018. godi-

ne zatražena je i dobivena službena dozvola za korištenje sadržaja smjernica u nacionalnim smjernicama uz jasnu napomenu na mjestima gdje to nije primijenjeno zbog specifičnosti postupaka i dijagnostičkih medicinskih proizvoda za test klorida u znoju u hrvatskim zdravstvenim ustanovama.

Priprema nacionalnih smjernica temelji se na anketnom istraživanju koje je provedeno 2018. godine. Prvi upitnik nadopunio je već objavljenу procjenu svih faza u izradi testa klorida u znoju u MBL (19). U drugom upitniku ispitano je korištenje elektroda za PI i praćenje indikatora kvalitete rada. Još jednim dodatnim upitnikom istražen je stav članova RG o nestandardiziranom instrumentu za PI koji se koristi u hrvatskim ustanovama. Pitanja iz drugog i trećeg upitnika odnose se na poglavlja gdje sadržaj drugog izdanja britanskih smjernica nije primjenjiv na centre u Hrvatskoj s obzirom na raspoloživu opremu za test klorida u znoju. Pregled rezultata i analize svih anketnih upitnika nalaze se u tablici 1 u prilogu 2.

Nacionalne preporuke sadrže sažete preporuke za izradu testa klorida u znoju. One su uz prethodnu službenu dozvolu preuzete iz drugog izdanja britanskih smjernica, osim na mjestima gdje je naznačeno „nezavisne preporuke RG“. Na tim su mjestima navedene nezavisne preporuke RG zbog specifičnosti opreme i postupaka za izradu testa klorida u znoju u Hrvatskoj. Detaljnije informacije o preporukama na neoznačenim mjestima nalaze se u britanskom izvorniku (21).

Nadalje, članovi RG pretražili su biomedicinsku bazu podataka MEDLINE pomoću PubMed tražilice, za razdoblje od 2013. do 2021. godine, zaključno s 01.02.2021.

Pretraživanje je napravljeno s ciljem pronalazjenja relevantnih radova za sadržaj preporuka u razdoblju između objavljivanja britanskih smjernica 2014. i nacionalnih smjernica, kako

bi se one uskladile s najnovijim saznanjima i preporukama.

U pretraživanju su korištene sljedeće ključne riječi na engleskom jeziku: *cystic fibrosis* (cistična fibroza), *sweat test* (test klorida u znoju), *sweat chloride* (kloridi u znoju), *conductometry* (konduktometrija) i *biological variation* (biološka varijacija).

Odabrani radovi su: nacionalne smjernice stručnih društva (12, 20), pregledni članak (14) i presječno istraživanje (25).

Za pretraživanje podataka na hrvatskom jeziku korišten je Google pretraživač (rujan-prosinac 2019. godine).

Autori nacionalnih smjernica koristili su AGREE metodologiju (engl. *The Appraisal of Guidelines for Research and Evaluation*) gdje god je bilo primjenjivo (26).

Nacionalne smjernice će se poslati na elektroničke adrese svih članova RG, stručnih društava i udruga koji su sudjelovali u njihovoj izradi i podržali njihovu završnu verziju. Elektronička verzija nacionalnih smjernica bit će dostupna na internetskoj stranici HDMBLM-a.

FINANCIJSKE POSLJEDICE STANDARDIZACIJE TESTA KLORIDA U ZNOJU

Prema rezultatima anketnog istraživanja ECFS-a u 136 centara i laboratorija u Europi, u kojem je sudjelovala i Hrvatska, kod više od polovice sudionika cijena testa klorida u znoju varira između 20 i 100 eura (27). Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje ugovorenim zdravstvenim ustanovama refinancira troškove izrade u iznosu od 55,6 kn ili 7,5 eura (28). S obzirom na to da standardizacija testa klorida u znoju podrazumijeva i uvođenje komercijalnih sustava i mjernih uređaja, može se očekivati dodatno financijsko opterećenje zdravstvenog

sustava u smislu izdvajanja za troškove tog testa. Njegova standardizacija treba osigurati kvalitetni dijagnostički postupak, smanjiti broj lažno negativnih rezultata te potrebu za ponavljanjem testiranja kod lažno pozitivnog nalaza, što bi u konačnici smanjilo ukupna izdvajanja zdravstvenog sustava za dijagnozu CF.

SADRŽAJ SMJERNICA

Novorođenački probir na cističnu fibrozu i test klorida u znoju

Nacionalni program za rijetke bolesti 2015-2020 Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske uključuje CF i prepoznaje da neke europske zemlje provode novorođenački probir na CF (13). Međutim, on za sada nije dio programa novorođenačkog probira u Hrvatskoj.

Budući da je test klorida u znoju nezaobilazan za potvrdu rezultata novorođenačkog probira na CF, potrebne su sljedeće preporuke:

- Pozitivni rezultat novorođenačkog probira na CF mora se potvrditi testom klorida u znoju koji uključuje PI i određivanje koncentracije klorida u znoju.
- Test klorida u znoju treba napraviti osoblje (laboratorijsko ili odjelno/ambulantno) s iskustvom testiranja dojenčadi mlađe od tri mjeseca.

Indikacije za test klorida u znoju

Nezavisne preporuke RG

- Liječnik iz primarne zdravstvene zaštite treba uputiti pacijenta sa sumnjom na CF na dijagnostičku obradu specijalisti za CF.
- Jednom kada se uvede nacionalni probir na CF, sva novorođenčad s pozitivnim rezultatom probira trebaju biti upućena u Centar za cističnu fibrozu.

Informiranje pacijenta i roditelja/ skrbnika o testu klorida u znoju

- Prije testiranja pacijenti i roditelji/skrbnici trebaju biti informirani o indikacijama za testiranje i namjeni testa klorida u znoju.
- MBL treba pripremi informativni sadržaj o testu klorida u znoju (nezavisne preporuke RG).
- Primjer informativnog letka za test klorida u znoju nalazi se u dodatku 3 i može se prilagoditi specifičnostima MBL i/ili klinike gdje se izvodi kloridi u znoj (nezavisne preporuke RG).

Pripremljenost pacijenta za test klorida u znoju

- Test klorida u znoju se preporučuje kod terminskog novorođenčeta koje je staro barem dva tjedna, teško više od 2 kg u vrijeme testiranja, normalno hidrirano i bez značajne sistemske bolesti.
- Test klorida u znoju ne preporučuje se prije sedmog dana života, pogotovo ne prije 48 sati života jer se u tom periodu može očekivati visoki udio neprihvatljivih rezultata PI i lažno povišenih koncentracija klorida u znoju.
- Test klorida u znoju treba odgoditi kod edematoznih ispitanika ili kod onih koji primaju topiramid ili 9-alfa fludrokortizon.
- Test klorida u znoju treba odgoditi kod ispitanika koji su dehidrirani, pothranjeni, nestabilnog kliničkog statusa ili imaju ekcem na mjestu stimulacije znojenja.
- Test klorida u znoju se može napraviti kod ispitanika na terapiji flukloksacilinom.
- Test klorida u znoju se ne preporučuje kod ispitanika na oksigenoterapiji primjenom maske sa rezervoarom (zvono za davanje kisika). Ova preporuka se ne odnosi na oksigenoterapiju kod djece primjenom nazalne kanile ili obične maske za kisik.

Izrada testa klorida u znoju

Mjesta za izradu pilokarpinske iontoforeze

- Preporučeno mjesto za PI je unutarnja strana podlaktice.
- Druga prihvatljiva mjesta su nadlaktica ili bedro ako su obje ruke ekcematozne ili su iz nekog drugog razloga neprikladne za PI.
- Nije dozvoljeno korištenje otopina za ispiranje koje sadrže klorid.
 - Dovoljno je napraviti PI samo na jednoj podlaktici, osim kad se očekuje uzorak s nedovoljnom masom ili volumenom znoja, ako je uzorak zagađen ili postoji neki drugi opravdani razlog.

Pilokarpinska iontoforeza

Preporuke za *in-house* PI

- Odabir supstanci za izradu otopina za *in-house* PI treba biti u skladu s monografijom Europske farmakopeje (nezavisna preporuka RG).
- Izvor struje za PI mora imati baterijsko napajanje i zaštitni prekidač koji ograničava jakost struje do maksimalno 5 mA.
- Elektrode (minimalno dvije) za PI moraju biti od nehrđajućeg čelika ili bakra, oblika i veličine takve da se mogu sigurno i bezbolno pričvrstiti na ispitanikovu podlakticu (nezavisna preporuka RG).
- Elektrode se moraju redovito kontrolirati i čistiti.
- Preporučena veličina elektroda iznosi 3,75 x 3,75 cm (nezavisna preporuka RG).
- Za poticanje znojenja treba koristiti otopinu pilokarpin nitrata (2-5 g/L).

- Veličina filter papira ili gaze (koji ne sadrže klorid) koji se koriste za poticanje znojenja treba biti veća od površine elektroda (nezavisna preporuka RG).
- Elektrode s filter papirom ili gazom koji su namočeni otopinom pilokarpin nitrata trebaju se učvrstiti na podlakticu tako da se onemogući njihovo pomicanje (nezavisna preporuka RG).
- Maksimalna struja od 4 mA treba se aplicirati barem tri minute, ali ne više od pet minuta.
- Filter papir ili gaza (koji ne sadrže klorid) za skupljanje znoja trebaju biti veći od stimulirane površine: na primjer, gazu ili filter papir veličine 5 x 5 cm treba koristiti za elektrode 3,75 x 3,75 cm (nezavisna preporuka RG).
- Prije izrade PI, filter papir ili gaza trebaju se staviti u prethodno označen i odvagani spremnik. Za odvagu treba koristiti analitičku vagu s očitanjem na četiri decimalna mjesta.
- Svaki spremnik s uzorkom znoja treba biti označen bar kodom pacijenta ili nekim drugim načinom identifikacije (nezavisna preporuka RG).
- Prethodno odvagani filter papir ili gaza za skupljanje znoja trebaju se staviti na mjesto izrade PI što je prije moguće kako bi se onemogućila kontaminacija ili evaporacija za vrijeme skupljanja znoja.
- Skupljanje znoj treba trajati 30 minuta.
- Nakon skupljanja znoja, filter papir ili gaza trebaju se vratiti u isti spremnik i dobro zatvoriti te poslati u MBL ako se PI radi u ambulanti ili dnevnoj bolnici (nezavisna preporuka RG).
- Prije analize znoja potrebno je napraviti odvagu filter papira ili gaze sa skupljenim znojem (nezavisna preporuka RG).
- Uzorak znoja sakupljen s različitih mjesta ne smije se pomiješati i analizirati (nezavisna preporuka RG).
- Korisnik mora napraviti verifikaciju instrumenta, opreme i materijala koje koristi za PI (nezavisna preporuka RG).

Preporuke za PI komercijalnom opremom

- Komercijalni instrument koji služi kao izvor struje mora imati baterijsko napajanje s automatskim sigurnosnim prekidačem.
- Za poticanje znojenja preporučuju se pilokarpinski gelirani diskovi koji sadrže pilokarpin nitrat koncentracije 2-5 g/L.
- Ne smiju se koristiti oštećeni pilokarpinski diskovi (nezavisna preporuka RG).
- Preporučuje se korištenje komercijalnih jednokratnih kolektora za skupljanje znoja.
- Komercijalna oprema ili materijali za poticanje znojenja ili njihovi dijelovi ne smiju se koristiti s *in-house* opremom za istu svrhu.

Stabilnost uzorka

- Znoj skupljen komercijalnom opremom može se čuvati tri dana na 2-8 °C u dobro zatvorenom spremniku.
- Znoj skupljen filter papirom ili gazom može se čuvati maksimalno tri dana u dobro zatvorenom spremniku na 2-8 °C.
- Masa skupljenog znoja mora biti u skladu sa zahtjevom o minimalnom intenzitetu lučenja znoja od 1 g/m²/min.
- Svaki MBL, ovisno o korištenoj opremi, treba odrediti minimalnu masu skupljenog znoja koja je prihvatljiva za analitičku fazu (prilog 4: „Izračun minimalne mase znoja“) (nezavisna preporuka RG).
- Ne smije se analizirati skupljeni znoj mase manje od minimalne mase.
- Ne preporučuje se eluiranje znoja duže od jednog sata (nezavisna preporuka RG).
- Eluat sadržaja znoja skupljenog na filter papir ili gazu treba promućkati prije analize.

Analiza znoja

- U analizi znoja za dijagnozu CF kao analit se preporučuje klorid.
- Ne preporučuje se određivanje osmolalnosti ili koncentracije natrija ili kalija u znoju.
- Kolorimetrija (kvantitativna), kulometrija i ion-selektivne elektrode preporučene su metode za analizu klorida u znoju.
- Konduktometrija nije prihvatljiva kao referentna metoda za dijagnostiku CF.
- Kod djece mlađe od šest mjeseci s normalnim nalazom konduktometrije treba napraviti test klorida u znoju koji uključuje određivanje koncentracije klorida.
- Kada je nalaz konduktometrijske metode pozitivan ili graničan kod djece starije od šest mjeseci i odraslih, treba napraviti test klorida u znoju koji uključuje određivanje koncentracije klorida.

Preporuke za određivanje koncentracije klorida *in-house* metodom (nezavisna preporuka RG)

- Merkurimetrijska titracija prema mikrometodi Schales-Schales prihvatljiva je analitička tehnika za određivanje koncentracije klorida u znoju ili eluatu znoja samo ako je validirana za analizu klorida u nativnom uzorku ili eluatu znoja.
- Otopina živa nitrata koja se koristi za MMT mora se sigurno ukloniti iz MBL-a prema uputama za uklanjanje opasnog otpada.

Konduktometrija

Koncentracije klorida u znoju određene Nano-ductom ili nekim drugim instrumentom koji koristi konduktometriju (mjerjenje vodljivosti elektrolita u znoju) u pravilu su više od koncentracija klorida određenih analitičkim metodama koje mjere samo koncentraciju klorida (npr. kulometrija).

Autori britanskih i australskih smjernica za izradu testa klorida u znoju smatraju da konduktometrija nije prihvatljiva za dijagnostiku CF (20, 21). Prema smjernicama za izradu klorida u znoju Američkog instituta za kliničke i laboratorijske standarde, ekvivalent $\text{NaCl} \geq 50$ mmol/L dobiven konduktometrijom treba biti potvrđen određivanjem koncentracije klorida u znoju (23).

Prema neobjavljenim podacima iz 2021. godine, Nano-duct je korišten na devet pedijatrijskih odjela i u jednom MBL-u u pet općih bolnica, jednoj županijskoj bolnici, dvije specijalne bolnice i jednom kliničkom bolničkom centru u većini hrvatskih županija.

Kontrola kvalitete

- Kontaminirani ili evaporirani uzorci ne smiju se koristiti za analizu (vidjeti u poglavlju o PI).
- Linearnost analitičke metode mora biti u rasponu koncentracija klorida kod zdravih osoba i oboljelih od CF.
- Postupci izrade testa klorida u znoju moraju biti dokumentirani u sustavu kontrole kvalitete u skladu s nacionalnim stručnim standardima (nezavisna preporuka RG).
- Unutarnja kontrola kvalitete (UKK) mora se koristiti kod izrade svake serije uzoraka.
- Dozvoljeno je koristiti *in-house* UKK (nezavisna preporuka RG).
- Za analizu svake serije uzoraka moraju se koristiti tri koncentracijska nivoa UKK: normalna koncentracija, < 30 mmol/L; granična koncentracija, 30-59 mmol/L; patološka koncentracija, ≥ 60 mmol/L (nezavisna preporuka RG).
- Metode za određivanje koncentracija klorida (ne odnosi se na konduktometriju) trebaju imati nepreciznost iz dana u dan nižu od 5% kod koncentracija između 40 i 50 mmol/L.

- Konduktometrijska metoda treba imati nepreciznost iz dana u dan nižu od 2% kod koncentracije 50 mmol/L.
- MBL mora sudjelovati u vanjskoj kontroli kvalitete (VKK).
- Rezultati UKK i VKK dio su medicinske laboratorijske dokumentacije i moraju se čuvati sukladno nacionalnim stručnim standardima (nezavisna preporuka RG).

Od 2015. godine, CROQALM osigurava nacionalnu vanjsku kontrolu kvalitete za analitičku fazu testa klorida u znoju u odvojenom modulu, tri ciklusa godišnje (jedan uzorak u svakom ciklusu). U toj VKK sudjeluju svi MBL u Hrvatskoj koji rade test klorida u znoju i izdaju njegove rezultate. Između 2015. i 2020. godine, kontrolni materijal bila je nekomercijalna, vodena otopina NaCl koncentracijskog raspona između 20 i 100 mmol/L. Od 2021. godine koristi se komercijalna kontrola kvalitete. Izvještaj VKK sadrži grafičke i tabularne prikaze, statističku analizu rezultata prema Tukey metodi, kao i interpretaciju prijavljenih koncentracija klorida (29).

- Fiziološki neprihvatljive koncentracije klorida >150 mmol/L ili >170 mmol/L (dobivene konduktometrijom) ne smiju se izdati u nalazu.
- U laboratoriju ili na mjestima izvan laboratorija gdje se radi PI mora se pratiti učestalost uzoraka s nedovoljnom masom ili volumenom znoja, oni smiju imati udio do 10% u testiranoj populaciji, isključujući ponovljena testiranja i djecu mlađu od šest mjeseci.
- Kod djece starije od šest mjeseci udio nedovoljne mase ili volumena znoja trebala bi biti manja od 5%.
- Kod djece mlađe od šest mjeseci udio nedovoljne mase ili volumena znoja ne smije biti veći od 20%.

Udio nedovoljne mase ili volumena znoja treba izraziti u postotku (%) u odnosu na ukupni broj testova i prema operatoru koji radi PI. Svi dokumenti o nedovoljnoj masi ili volumenu znoja

moraju se čuvati s ostalom dokumentacijom o testu klorida u znoju. U prilogu 5 nalazi se popis indikatora kvalitete izrade te pretrage.

- Testiranje se mora ponoviti ako rezultat ne odgovara kliničkom stanju ispitanika i/ili rezultatima genetičkog ispitivanja.
- Popis mogućih razloga lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata testa klorida u znoju nalazi se u prilogu 6 (20).
- Nalazi testa klorida u znoju trebali bi se raspraviti s kliničarima, pogotovo ako je potrebno ponoviti testiranje.

Referentni intervali i tumačenje rezultata

Koncentracija klorida (kulometrija, kolorimetrija i ion selektivne elektrode)

Nezavisna preporuka RG (12)

Normalna koncentracija ≤ 29 mmol/L

Granična koncentracija 30-59 mmol/L

Povišena koncentracija ≥ 60 mmol/L

Ekvivalenti NaCl (konduktometrijska metoda)

Normalna koncentracija < 50 mmol/L

Granična koncentracija 50-90 mmol/L

Povišena koncentracija > 90 mmol/L

Biološka varijacija i klinički značajna promjena

Nezavisne preporuke RG

- Laboratorij može koristiti podatke o biološkoj varijaciji klorida u znoju iz baze podataka koji su prikladni za testiranu populaciju.
- Laboratorij koji koristi standardizirani postupak PI i analize klorida u znoju može ko-

ristiti klinički značajnu promjenu u svrhu procjene kliničkog značaja rezultata koncentracije klorida u znoju (25).

Sadržaj i izgled nalaza

Nalaz treba sadržavati informacije koje omogućuju identifikaciju pacijenta, datum i vrijeme testiranja te izdavanja nalaza, naziv analita i vrstu uzorka iz koje je analit analiziran, rezultat, analitičke jedinice i naziv korištene metode, referentni interval, tumačenje rezultata i razlog zbog kojeg rezultat nije izdan.

- Sadržaj i izgled nalaza iz MBL-a mora biti u skladu s nacionalnim preporukama Radne grupe za poslijeanalitičku HDMBLM-a (30) (nezavisna preporuka RG).
- Masa ili volumen skupljenog znoja mora biti naznačen na laboratorijskom nalazu (20) (nezavisna preporuka RG).

Odgovornost za edukaciju i testiranje

PI i analizu klorida u znoju smije raditi isključivo educirano i iskusno osoblje.

- Svi postupci edukacije osoblja i njene procjene moraju biti definirani.
- Svi oblici edukacije osoblja moraju biti dokumentirani.
- Educirani zdravstveni djelatnik treba napraviti minimalno 10 testiranja godišnje sa svrhom zadržavanja vještine izrade testa (nezavisna preporuka RG).

Magistar medicinske biokemije, specijalist medicinske biokemije i laboratorijske medicine, liječnik i/ili specijalist laboratorijske medicine odgovoran je za edukaciju i evaluaciju osoblja koje radi test klorida u znoju u MBL-u, kao i za kontrolu radnog postupka, uključujući procjenu kontrole kvalitete i indikatora kvalitete, izgled i izdavanje nalaza, kao i komunikaciju s

drugim specijalistima. Svaku fazu izrade testa u MBL-u treba kontrolirati specijalist, uključujući analizu neočekivanih rezultata i primjenu popravni radnji (nezavisna preporuka RG).

- Ako se test klorida u znoju u potpunosti ili djelomično radi izvan MBL-a, magistar medicinske biokemije, specijalist medicinske biokemije i laboratorijske medicine, liječnik i/ili specijalist laboratorijske medicine treba nadzirati procjenu kontrole kvalitete (uključujući periodične revizije indikatora kontrole) i neočekivane rezultate, kao i primjenu popravni radnji (nezavisna preporuka RG).
- Liječnik ili medicinska sestra koji nadziru izradu testa klorida u znoju, bilo da se u cijelosti ili djelomično radi izvan MBL-a, trebaju dokumentirati zapise o edukaciji, evaluaciji i osposobljenosti osoblja. Oni su odgovorni za izradu testa u skladu s pisanim uputama i pohranu podataka o izdavanju nalaza te procjeni kontrole kvalitete (uključujući procjenu udjela NKZ i neuspješnih testiranja svakog operatora) (nezavisna preporuka RG).

Nadzor nad primjenom nacionalnih smjernica u medicinsko-biokemijskim laboratorijima

Nacionalne smjernice pripremljene su u suradnji HDMBLM i Centra za cističnu fibrozu djece i odraslih, KBC Zagreb. Prije objavljivanja treba ih ocijeniti Povjerenstvo za stručna pitanja Hrvatske komore medicinskih biokemičara, ali i zainteresirano članstvo HDMBLM-a putem javne rasprave koju organizira HDMBLM.

PREGLED I NADOPUNA PRVOG IZDANJA

Radna grupa planira pripremiti drugo izdanje nacionalnih smjernica 10 godina od datuma objavljivanja prvog izdanja.

ZAHVALA

RG SKZ želi zahvaliti predstavnicima: Hrvatskog društva za pedijatrijsku gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu doc. dr. sc. Orjena Žaja, Hrvatskog društva za pedijatrijsku pulmologiju prof. dr. sc. Neven Pavlov, Hrvatskog gastroenterološkog društva prof.dr.sc. Neven

Ljubičić i prof. dr. sc. i Sandra Milić, Hrvatske udruge medicinskih sestara Kristina Kužnik, mag. med. techn., Hrvatske udruge oboljelih od cistične fibroze Tomislav Levak, bacc. inf. za podršku završne verzije nacionalnih smjernica.

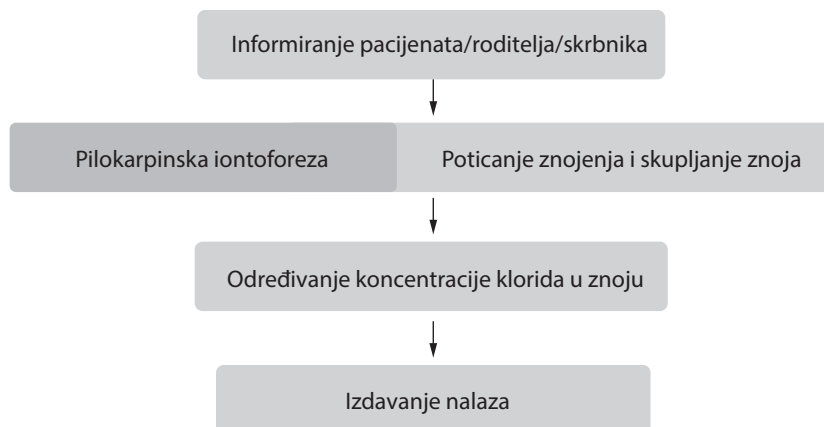
LITERATURA

1. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet* 2009;373:1891-904.
2. Tješić-Drinković Du, Percl M, Tješić-Drinković Do, Čohar B, Dujšin M, Hegeduš-Jungvirth M et al. Postupnik za dijagnozu cistične fibroze Hrvatskog društva za pedijatrijsku gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu Hrvatskog liječničkog zbora. *Paedriatria Croatica* 2004;48:141-45.
3. Villeneuve G, Marceniuk G, Murphy SM, Walshaw M, Cosulich R; Guideline Committee. Diagnosis and management of cystic fibrosis: summary of NICE guidance. *BMJ* 2017;359:j4574.
4. Southern KW, Mérelle MM, Dankert-Roesle JE, Niggelkerke AD. Newborn screening for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(1):CD001402.
5. Farrell PM. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros*. 2008;7:450-53.
6. Burgel PR, Bellis G, Olesen HV, Viviani L, Zolin A, Blasi F, et al. ERS/ECFS Task Force on Provision of Care for Adults with Cystic Fibrosis in Europe. Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. *Eur Respir J*. 2015;46:133-41.
7. Zolin A, Orenti A, Naehrlich L, Jung A, van Rens J, et al. European Cystic Fibrosis Society. *ECFSPR Annual Report 2018*. ECFS [Internet]. Dostupno na: https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-files/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSPR_Report2018_v1.4.pdf. Pristupljeno 1. prosinca 2020.
8. Croatian Bureau of Statistics. *Statistical Yearbook of the Republic of Croatia*. Dostupno na: <https://www.dzs.hr/>. Pristupljeno 1. prosinca 2020.
9. Mehta G, Macek MJ, Mehta A; European Registry Working Group. Cystic fibrosis across Europe: EuroCareCF analysis of demographic data from 35 countries. *J Cyst Fibros* 2010;9 (supl.2):S5-S21. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2010.08.002>. Pristupljeno 1. prosinca 2020.
10. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* 1998;132: 589-95.
11. Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M; Diagnostic Working Group. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 2006;61:627-35.
12. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr* 2017;181:S4-S15.
13. Ministry of Health, Republic of Croatia. *Rare Diseases National Plan 2015. – 2020*. Dostupno na: [https://zdravstvo.gov.hr/UserDocsImages//Programi%20i%20projekti%20-%20Ostali%20programi//NACIONALNI-PROGRAM-ZA-RIJETKE-BOLESTI-2015-%202020.g.%20\(1\).docx](https://zdravstvo.gov.hr/UserDocsImages//Programi%20i%20projekti%20-%20Ostali%20programi//NACIONALNI-PROGRAM-ZA-RIJETKE-BOLESTI-2015-%202020.g.%20(1).docx). Pristupljeno 2. siječnja 2021.
14. Castellani C, Linnane B, Pranke I, Cresta F, Sermet-Gaudelus I, Peckham D. Cystic Fibrosis Diagnosis in Newborns, Children, and Adult. *Semin Respir Crit Care Med* 2019;40:701–14.
15. Mishra A, Greaves R, Massie J. The Relevance of Sweat Testing for the Diagnosis of Cystic Fibrosis in the Genomic Era. *Clin Biochem Rev* 2005;26:135-54.
16. Muhlebach MS, Clancy JP, Heltshe S, Ziady A, Kelly T, Accurso F et al. Biomarkers for Cystic Fibrosis Drug Development. *J Cyst Fibros* 2016;15:714-23.
17. Ibbott FA. Chloride in Sweat. In: Meites S, eds. *Standard Methods of Clinical Chemistry*, New York and London: Academic Press; 1965. p. 101-11.
18. Johner Institute. Laboratory Developed Test. Dostupno na: <https://www.johner-institute.com/articles/regulatory-affairs/and-more/laboratory-developed-tests/>. Pristupljeno 15. prosinca 2019.
19. Aralica M, Leniček-Krleža J. Evaluating performance in sweat testing in medical biochemistry laboratories in Croatia. *Biochem Med*. 2017;27:122-30.
20. Massie J, Greaves R, Metz M, Wiley V, Graham P, Shepherd S et al. *Australasian Guideline (2th Edition): an Annex to the CSLI and UK Guidelines for the Performance of the Sweat Test for the Diagnosis of Cystic Fibrosis*. *Clin Biochem Rev*. 2017;38:115-30.
21. *Guidelines for the Performance of the Sweat Test for the Investigation of Cystic Fibrosis in the UK (Version 2)*. An Evidence Based Guideline, 2014.
22. ELITechGroup. *Nanoduct® Neonatal Sweat Analysis System*. Dostupno na: <https://www.elitechgroup.com/product/nanoduct-neonatal-sweat-analysis-system-2>. Pristupljeno 25. rujna 2019.
23. LeGrys VA, Gibson LE, Hammond RB, Kraft K, Rosenstein BJ. *Sweat testing: sample collection and quantitative analysis; approved guideline*. Second Edition: US National Committee for Clinical Laboratory Standards Document C34-A2 (ISBN 1-556238-407-4) 2000. NCCLS, Pennsylvania, USA; 2009.
24. Croatian Centre for Quality Assessment in Laboratory Medicine (CROQALM). *Search modules VKK 2019*. Dostupno na: https://croqalm.hdmblm.hr/images/moduli_i_pretrage/2019/MODULI_I_PRETRAGE_2019_HR.pdf. Pristupljeno 30. listopada 2019.
25. LeGrys VA, Moon TC, Laux J, Rock MJ, Accurso F. Analytical and biological variation in repeated sweat chloride concentrations in clinical trials for CFTR modulatory therapy. *J Cyst Fibros* 2018;17:43-9.

26. AGREE Next Steps Consortium. *The AGREE II Instrument*. Dostupno na: <https://www.agreetrust.org/wp-content/uploads/2017/12/AGREE-II-Users-Manual-and-23-item-Instrument-2009-Update-2017.pdf>. Pristupljeno 6. rujna 2019.
27. Cirilli N, Southern KW, Buzzetti R, Barben J, Nahrlich L, Munck A et al. Real life practice of sweat testing in Europe. *J Cystic Fibros* 2018;17:325-32.
28. Croatian Health Insurance Fund. *List of compulsory health insurance healthcare procedures. List of diagnostic-therapeutic procedures in specialist-consiliary health care*. Dostupno na: <http://www.hzzo.hr/wp-content/uploads/2013/10/Dijagnosti%C4%8Dko-terapijski-postupci-u-specijalisti%C4%8Dko-konzilijarnoj-zdravstvenoj-za%C5%A1iti-2018.xlsx>. Pristupljeno 6. rujna 2019.
29. Tukey JW. *Exploratory Data Analysis*. Reading, MA: Addison-Wesley; 1977. Dostupno na: http://www.ru.ac.bd/wp-content/uploads/sites/25/2019/03/102_05_01_Tukey-Exploratory-Data-Analysis-1977.pdf. Pristupljeno 28. kolovoza 2021.
30. Lenicek Krleza J, Honovic L, Vlastic Tanaskovic J, Podolar S, Rimac V, Jokic A. Post-analytical laboratory work: national recommendations from the Working Group for Post-analytics on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochem Med* 2019;29:020502.

PRILOG 1.

Dijagram izrade testa klorida u znoju.



PRILOG 2.

Pregled rezultata anketnog istraživanja o prijeanalitičkoj i analitičkoj fazi testa klorida u znoju

Prijeanalitička faza

U 2018. godini izrada PI *in-house* priborom i materijalima bio je rutinski postupak u devet zdravstvenih ustanova, uključujući šest MBL-a i tri pedijatrijske ambulante u sekundarnoj i tercijarnoj zdravstvenoj zaštiti. U jednom centru korišten je Nanoduct. Podaci iz tog MBL-a nisu uključeni u prezentaciju rezultata.

U svim ustanovama poticanje znojenja i skupljanje znoja radilo se na unutarnjoj strani podlaktice. U postupku poticanja znojenja svi su koristili isti instrument (JOS Instruments, Hrvatska) koji nema mogućnost baterijskog napajanja niti sigurnosni prekidač. U osam od devete ustanova, za PI su korištene dvije elektrode (JOS Instruments) u obliku narukvice širine 8 mm i podesive dužine 30 cm.

U osam od devet ustanova za poticanje znojenja korištena je *in-house* otopina pilokarpin klorida. Šest od devet MBL-a koristilo je analitičku vagu na četiri decimale.

U dvije od devet ustanova znoj je sakupljan filter papirom, ali niti jedna ustanova nije prijavila korištenje preporučenih materijala koji ne sadrže klorid; u preostalih sedam ustanova korištena je gaza za skupljanje znoja. Nakon skupljanja znoja, u tri od devet ustanova korišteni filter papir ili gaza spremni su u Petrijevu zdjelicu, u tri ustanove u plastični spremnik, a u preostale tri u stakleni spremnik. U tri od devet MBL-a skupljeni sastav znoja eluiran je destiliranom vodom minimalno 40 min, dok je u preostalih šest MBL-a eluiranje je trajalo do jedan sat. U tri MBL-a eluati su čuvani na 2-8 °C, u četiri na 15-25 °C, dok u preostala dva centra nisu čuvali. U upitniku se nije tražilo vrijeme čuvanja eluata.

Do kraja 2019. godine, tri od devet ustanova prijavile su neželjene događaje koji su posljedica izrade PI. U osam od devet centara smatrali su da instrument za PI nije prikladan za rad.

Analitička faza

Svi MBL-i određivali su koncentraciju klorida u znoju MMT prema mikrometodi Schales-Schales. Osam od devet laboratorija koristilo je *in-house* kalibrator, dok je jedan koristio komercijalni kalibrator. Dva od devet laboratorija koristila su kombinaciju komercijalnih i *in-house* reagensa za MMT, dok je ostalih sedam koristilo samo *in-house* reagens. Sedam od devet

MBL-a radilo je titraciju uzoraka u duplikatu. Pet od devet laboratorija koristilo je UKK, ali svi MBL sudjelovali su u sva tri ciklusa godišnje CROQALM modula „Kloridi u znoju“. Dva od tri laboratorija također su sudjelovala u shemi *Randox International Quality Assessment Scheme* za test klorida u znoju.

TABLICA 1. Pregled rezultata anketnog istraživanja

Postupak izrade testa klorida u znoju	Broj MBL i pedijatrijskih ambulanta (prijeanalitička faza) (Ukupni broj zdravstvenih ustanova = 9)
Prijeanalitička faza	
<i>In-house</i> materijali i oprema za PI	9
Unutarnja strana podlaktice kao mjesto za PI	9
Nestandardizirani izvor napajanja	9
Dvije elektrode u obliku narukvice	8
Otopina pilokarpin klorida	8
Analitička vaga na četiri decimale	6
Filter papir za skupljanje znoja	2
Gaza za skupljanje znoja	7
Čuvanje filter papira ili gaze	
Petrijeva zdjelica s poklopcem	3
Plastični spremnik	3
Stakleni spremnik	3
Vrijeme eluiranja	
Najmanje 40 min	3
Do jednog sata	6
Čuvanje eluata	
2-8 °C	3
15-25 °C	4
Ne čuva se	2
Analitička faza	
Merkurimetrijska titracija	9
<i>In-house</i> kalibrator	8
Samo <i>in-house</i> reagensi	7
Titracija u duplikatu	7
Kontrola kvalitete	
Unutarnja kontrola kvalitete	5
Vanjska kontrola kvalitete	9

PRILOG 3.

Primjer informativnog letka o testu klorida u znoju

Ovaj informativni letak namijenjen je pacijentima i roditeljima/skrbnicima djece koja su upućena na test klorida u znoju.

Što je test klorida u znoju?

Test klorida u znoju je jednostavan, neinvazivni postupak koji se sastoji do nekoliko faza: poticanje znojenja, skupljanje znoja, i analize klorida u znoju. Testiranje je bezbolno, ali može uzrokovati senzacije na mjestu poticanja znojenja.

Zašto se izvodi test klorida u znoju?

Na test klorida u znoju upućuju se djeca koja često imaju proljeve ili infekcije dišnih puteva, zatim ona koja ne dobivaju na težini ili imaju druge znakove cistične fibroze. Povišena koncentracija klorida u znoju može govoriti u prilog cistične fibroze, ali konačnu dijagnozu mora postaviti specijalist nakon razmatranja djetetovih simptoma, rezultata drugih testiranja i povijest bolesti u užoj obitelji.

Gdje i kada se radi test klorida u znoju?

Test klorida u znoju se uglavnom radi u medicinsko-biokemijskom laboratoriju, na pedijatrijskom odjelu ili ambulanti.

Testiranje se može zakazati telefonom ili elektroničkom poštom.

Što je korisno znati prije testiranja?

Uspješnost testiranja jako ovisi o stanju djeteta i senzibiliziranosti roditelja/skrbnika na testiranje. Na dan testiranja, dijete smije uzeti 0,5-2 litre tekućine (ovisno o dobi).

Na dan testiranja dijete treba biti dobro hidrirano bez povišene temperature, edema ili crvenila kože na obje podlaktice. Na dan testiranja na kožu ruku djeteta ne smije se nanositi nikakva krema ili losion. Prije testiranja poželjno je da dijete pojede uobičajeni obrok.

Kako se izvodi test klorida u znoju?

Test se izvodi u nekoliko faza:

Prva faza – poticanje znojenja

Unutarnja strana podlaktice ispere se destiliranom vodom i posuši.

Gaza ili filter papir se natope određenom otopinom i stave na kožu ispod dviju elektroda. Potom se sve skupa učvrsti. Elektrode su spojene na izvor slabe struje koji omogućuje da se koža oznoji na tom mjestu. Postupak traje pet minuta, a za to vrijeme dijete može osjetiti lagano peckanje na mjestu poticanja znojenja.

Druga faza – skupljanje znoja

Nakon poticanja znojenja, gaza ili filter papir se skidaju s podlaktice i koža se ispire destiliranom vodom. Mjesto poticanja znojenja može biti lagano crveno. Na mjesto poticanja znojenja postave se filter papir ili gaza za skupljanje znoja koje traje 30 minuta. U tom razdoblju dijete se može kretati, igrati, jesti i piti. Ipak, slane grickalice se trebaju izbjegavati. Ako se testiranje radi dojenčetu, potrebno ga je dobro utopiti. Kad završi skupljanje znoja, filter papir ili gaza uklanjaju se s djetetove podlaktice.

Analitička faza

U laboratoriju se određuje koncentracija klorida u skupljenom znoju.

Koliko dugo se čeka na izdavanje nalaza?

Nalaz se uglavnom izdaje unutar 24 sata.

Informacije o rezultatima testiranja

Nalaz se upućuje elektroničkim putem liječniku koji zatražio izradu testa.

Dodatne informacije

Dodatne informacije moguće je dobiti telefonom ili elektroničkom poštom. Rezultat testa tumači specijalist koji je zatražio testiranje.

PRILOG 4.**Izračun minimalne mase znoja**

Minimalna masa skupljenog znoja može se izračunati prema sljedećoj formuli uz pretpostavku da intenzitet znojenja iznosi 1 g/m²/min:

$$\frac{10\,000}{A \text{ (cm}^2\text{)}} \times \frac{m \text{ (mg)}}{1000} \times \frac{1}{t \text{ (min)}} = \frac{10 \times m \text{ (mg)}}{A \text{ (cm}^2\text{)} \times t \text{ (min)}}$$

$$m \text{ (mg)} = \frac{A \text{ (cm}^2\text{)} \times t \text{ (min)}}{10}$$

m – masa skupljenog znoja (mg)

t – vrijeme skupljanja znoja (t)

A – površina filter papira ili gaze za skupljanje znoja (cm²)

Primjer izračuna:

t = 30 min

A = 25 cm² (npr. gaza ili filter papir veličine 5 x 5 cm)

m (mg) = 25 (cm²) x 30 (min) / 10 = 75

PRILOG 5.

Popis indikatora kvalitete izrade testa klorida u znoju

- Rezultati UKK.
- Nepreciznost iz dana u dan treba biti <5% kod koncentracije klorida između 40 i 50 mmol/L.
- Nepreciznost iz dana u dan treba biti <2% kod koncentracije klorida od 50 mmol/L (konduktometrijska metoda).
- Rezultati VKK.
- Postotak uzoraka s nedovoljnom masom ili volumenom znoja u testiranoj populaciji u periodičnoj analizi treba biti:
 - < 5% kod djece starije od šest mjeseci
 - < 20% kod djece mlađe od šest mjeseci
 - < 10% u ciljanoj populaciji
- Postotak uzoraka s nedovoljnom količinom znoja po operatoru.

PRILOG 6.

Popis mogućih razloga lažno pozitivnog i lažno negativnog rezultata testa klorida u znoju

- Nutricijski status i hidriranost pacijenta.
- Kontaminacija kože sredstvom koje sadrži kloride.
- Nedovoljno ispiranje nakon PI.
- Neuspješno poticanje znojenja.
- Evaporacija znoja za vrijeme njegovog skupljanja ili vaganja.
- Odabir neodgovarajuće analitičke metode.
- Nepravilno korištenje odabrane metode.
- Nedostatak vještina za izradu odabrane metode.

PRILOG 7.

Popis kometara pristiglih na javnu raspravu i odgovor Radne grupe za standardizaciju testa klorida u znoju

Kometari	Odgovori Radne grupe SKZ
str. 20., ZT (konačnoj verziji nacionalnih smjernica test klorida u znoju) se ne može određivati novorođenčadi tjelesne mase manje od 3 kg (u tekstu je 2 kg). To mi je poznato iz više izvora – 1. od pedijataru s kojima sam surađivala, pa i od pedijataru iz Klinike za dječje bolesti i 2. iz dvije reference (reference 2 i 36) koje smo citirali u radu Dodig S., Pavić I. Kloridi u znoju i sigurnost pacijenta. Paediatr Croat. 2018;62:156-161. (rad šaljem u privitku, ako ga slučajno nemate, a možete ga i citirati u popisu literature)	Preporuka o pripremljenosti pacijenta za znojni test (u konačnoj verziji nacionalnih smjernica test klorida u znoju) glasi „Test klorida u znoju se preporučuje kod terminskog novorođenčeta koje je staro barem dva tjedna, teško više od 2 kg u vrijeme testiranja, normalno hidrirano i bez značajne sistemske bolesti“. Ona je preuzeta iz drugog izdanje britanskih smjernica na kojima se temelje nacionalne smjernice, kako je navedeno u poglavlju Smjernice za izradu znojnog testa (testa klorida u znoju).
U Nacionalnim smjernicama ne spominju se vrijednosti klorida kod odraslih osoba, što bi bilo dobro dodati. Govorim iz iskustva jer sam se kroz svoje 42 radne godine nazvojila i djece i odraslih koje su mi upućivali doktori iz KB Jordanovac. Kod tih pacijenata cistična fibroza nije bila prepoznata u dječjoj dobi nego tek u odrasloj dobi. Podatke o vrijednostima u odraslih možete također pronaći u spomenutom radu.	U nacionalne smjernice u poglavlju Analiza znoja unesena je korekcija o vrijednostima klorida kod odraslih osoba.
Na str. 21. piše u zadnjem retku da se PI izvodi na unutarnjoj strani podlaktice, dodala bih u zagradi (zapešća), jer su ondje žlijezde znojnice najbliže površini kože .	Mjesto izrade PI preuzeto je iz drugog izdanja britanskih smjernica na kojem se temelje predložene nacionalne smjernice.
Možda bi još jače trebalo naglasiti da je izuzetno važno da poticanje znojenja i uzorkovanje znoja uz krevet bolesnika provodi dobro educirano osoblje. Moje iskustvo je vrlo loše kad su taj dio radile sestre na odjelu. One rade u smjenskom radu i uvijek je neka druga u smjeni, a glavne sestre nisu baš bile zainteresirane za taj dio posla. O tome pišete u Smjernicama, ali možda bi bilo dobro to još jače naglasiti.	U sažetku i uvodu nacionalnih smjernica te u samom sadržaju preporuka naglašava se značaj educiranosti osoblja i vještine u izradi test klorida u znoju (znojnog testa). Osim toga poglavlje Odgovornost za edukaciju i testiranje posvećeno je edukaciji i nadzoru testiranja izvan laboratorija.
Nije jasno radi li se o smjernicama HDMBLM-a (odnosno RG SZT) koju su odobrila i druga spomenuta stručna društva ili je smjernica nastala u suradnji (i s odobrenjem) svih navedenih stručnih društava kao zajednička smjernica. Molim pojasniti u tekstu.	Nacionalne smjernice nastale su u suradnji RG za standardizaciju testa klorida u znoju koja uključuje članove HDMBLM iz laboratorija u kojima se radi test klorida u znoju (unutar CROQALM mreže) i specijalistu za cističnu fibrozu iz Centra za cističnu fibrozu, KBC Zagreb Završnu verziju smjernica podržala su društva i udruge koji su navedeni u Zahvali.
Ako se novorođenački probir za CF ne izvodi u RH, nije ga potrebno spominjati.	Test klorida u znoju je obavezni dio novorođenačkog probira na cističnu fibrozu. Zbog toga je potrebno spomenuti novorođenački probir u kontekstu testa klorida u znoju.
U laboratorijskoj dijagnostici nije uobičajeno koristiti termin dosljedno i/ili nedosljedno. Molim promijeniti (harmonizirano ili ne, ili standardizirano ili ne). Osiguranje dosljednosti je u biti harmonizacija samog postupka.	Navedeni termin je nužan u kontekstu neusklađenosti izrade znojnog testa.
Potrebno je u uvodu naglasiti kako su smjernice nastale (probirom literature, konsenzusom stručnjaka u tom području itd.) i kome su one namijenjene.	Proces nastajanja smjernica i njihova namjena navedeni su u uvodnom dijelu.

Kometari	Odgovori Radne grupe SKZ
<p>Str. 10-12: U ovom se poglavlju nepotrebno opisuje način izvođenja znojnog testa (odnosi se i na prilog 1). Treba imati na umu da laboratoriji koji ZT (test klorida u znoju u završnoj verziji nacionalnih smjernica) izvode poznaju predanalitiku, analitiku i postanalitiku samog testa. Dodatno, nije jasno odnosi li se opis na preporučeni postupak ili općenito na način postupanja pri izvođenju ZT-a. Molim skratiti ili izostaviti cijelo poglavlje ako nije riječ o specifičnim preporukama. Također, str. 12: „Glavni cilj Nacionalnih smjernica za izradu znojnog testa (NSIZT) u dijagnostici CF je standardizacija ZT-a u zdravstvenim ustanovama u Hrvatskoj, osiguravanje kvalitetnog i ujednačenog postupka neovisno o mjestu izrade ZT, te točnost u izvještavanju rezultata i njihovom tumačenju.“ – je pitanje standardizacija ili harmonizacija ZT-a.</p>	<p>Obzirom da se radi o specifičnim smjernicama koje su namijenjene laboratorijskom osoblju i osoblju na pedijatrijskim klinikama (u nekim hrvatskim zdravstvenim ustanovama pilokarpinska iontoforeza izvodi se izvan laboratorija), smatramo da je ovo poglavlje potrebno. Također, zadržava se termin standardizacija kako je objašnjeno na kraju poglavlja o ciljevima smjernica. Prilog 1. kratki je dijagram izrade testa klorida u znoju i uveden je u smjernice na prijedlog recenzenta.</p>
<p>Podrška stručnih društava i udruga Navedi ukratko u uvodu ili zahvalama na kraju teksta.</p>	<p>Podrška stručnih društava i udruga premještena je na kraj teksta pod zahvale.</p>
<p>Preporuke je potrebno jasno istaknuti te numerirati radi lakšeg praćenja i snalaženja u rutinskom radu. Radi lakšeg praćenja, preporuke bi trebalo podijeliti na predanalitičku, analitičku i poslijeanalitičku fazu (te su se faze prethodno u tekstu spominjale). Svaka preporuka bi trebala sadržavati kratko objašnjenje. Ako je preuzeta iz već publicirane preporuke (strane), potrebno je jasno navesti referencu iz koje je preporuka preuzeta.</p>	<p>U tekstu je navedeno da su nacionalne smjernice sažete preporuke koje su preuzete iz drugog izdanja britanskih smjernica osim na mjestima gdje je naznačeno „nezavisne preporuke RG“ (str 17). S obzirom na to da je testiranje zahtjeva manualnu vještinu pogotovo u predanalitičkoj fazi, mišljenja smo da je potrebno iscrpno opisati svaki korak u njegovoj izradi što može dovesti do odstupanja od uobičajenog načina organizacije teksta u časopisu Biochemia Medica.</p>
<p>„Primjer informativnog letka za ZT (test klorida u znoju u konačnoj verziji smjernica) nalazi se u dodatku 3.“ – u dodatku 3 je naveden primjer informativnog letka za ZT. Tko ga sastavlja i tko ga distribuira? Može li se primjer informativnog letka prilagoditi potrebama pojedinačnog laboratorija?</p>	<p>U sadržaju smjernica navedene su izmjene da informativni letak sastavlja medicinsko-biokemijski laboratorij i da se primjer tog letka može prilagoditi potrebama pojedinačnog laboratorija.</p>
<p>Str. 25 i dalje do str. 27 (kontrola kvalitete): Preporuke za analizu znoja, odnosno određivanje klorida u znoju (ako se ono jedino preporuča) trebale bi biti jednoznačne i nedvojbene.</p>	<p>Komentirani dio preporuka je preuzet iz već spomenutih britanskih smjernica i revidiran prije prihvaćanja u časopisu Biochemia Medica.</p>
<p>Str. 28: Detaljan opis nacionalne VKK i korištene statističke obrade podataka nije u skladu s ciljem dokumenta. Potrebno je propisati preporučenu vrstu uzorka i preporučenu učestalost te način dokumentiranja rezultata za UKK i VKK.</p>	<p>Opis vanjske kontrole kvalitete navodi se u međunarodnim smjernicama za test klorida u znoju pa smo mišljenja da ga je potrebno, pogotovo jer je jedan od CROQALM modula.</p>
<p>Sugestija Povjerenstva za stručna pitanja HKMB – razmotriti „promjenu naziva znojni test u test klorida u znoju“.</p>	<p>Naziv „test klorida u znoju“ u hrvatskoj verziji nacionalnoj smjernica zamijenio je prethodni naziv „znojni test“ na svima mjestima u naslovu, sadržaju i prilogima. Sugestija je prihvaćena jer predloženi naziv odgovara u rutinskom radu udomaćenom terminu za tu pretragu. U engleskoj verziji nacionalnih smjernica korišten je engleski naziv „sweat test“ u kontekstu dijagnostike cistične fibroze kako je navedeno i u međunarodnim smjernicama za dijagnozu te bolesti.</p>

Dragi članovi,

Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu definiralo je unaprjeđenje kvalitete laboratorijskog rada u Hrvatskoj kao jedan od svojih glavnih strateških ciljeva. U tu svrhu osnovan je velik broj Radnih grupa čiji je cilj promicanje harmonizacije i standardizacije laboratorijskih postupaka u svim fazama laboratorijskog rada.

Kao rezultat rada Radne grupe za ekstravaskularne uzorke HDMBLM-a nastale su ove preporuke, a još je nekoliko dokumenata u pripremi te će uskoro biti dostupne svim članovima Društva.

U nadolazećem razdoblju najavljujemo:

- Preporuke za postupanje s hemolitičnim, lipemičnim i ikteričnim uzorcima
- Preporuka za obradu mokraće
- Preporuke za određivanje antitijela na citoplazmu neutrofilnih granulocita (ANCA)
- Preporuke za pretrage uz bolesnika

ISBN: 978-953-96611-5-9