

Diagnostyka laboratoryjna wybranych schorzeń w pediatrii

Hipoglikemia noworodków

- hipoglikemia u noworodków to stan nagły zagrażający życiu
- stężenie glukozy, przy którym mogą pojawić się objawy hipoglikemii zależy od wieku dziecka, warunków klinicznych, stanu odżywienia i dojrzałości wątroby
- hipoglikemia jest częsta w pierwszych godzinach życia (poniżej 72 godzin)

Hipoglikemia noworodków

- nie ma jednej przyczyny hipoglikemii
- występuje częściej jeśli obecne są czynniki ryzyka takie jak: niska waga urodzeniowa, wcześniactwo, anemia, zespół niedomogi oddechowej, a także u dzieci matek z cukrzycą i z podwyższonym poziomem TSH

Hipoglikemia noworodków

- stężenie glukozy we krwi noworodka znacznie niższe w porównaniu z dziećmi starszymi i dorosłymi (u płodu ok. 3 mmol/L - 54 mg/dl)

- hipoglikemia ≤2,6 mmol/L (47 mg/dl) - nawet u dziecka bez objawów

Podejście „pragmatyczne”

- *jednorazowe stwierdzenie stężenia glukozy <1 mmol/L (<18 mg/dl)*
- *w dwóch niezależnych pomiarach glukoza <2,5 mmol/L (<45 mg/dl)*
- *pojedynczy pomiar glukozy <2,5 mmol/L (<45 mg/dl) u noworodka z objawami*

Hipoglikemia noworodków

- **Hipoglikemia hiperinsulinowa**
  - wrodzony hiperinsulinizm
  - wtórny efekt cukrzycy u matki
  - opóźniony wzrost wewnątrzmaciczny
- **Hipoglikemia bez hiperinsulinemii**
  - na tle zaburzeń oksydacji kwasów tłuszczowych
  - niedobory enzymów biorących udział w procesie glukoneogenezy
  - niedobór adrenaliny kortyzolu, hormonu wzrostu

Hipoglikemia noworodków – inne przyczyny

- sepsa,
- choroby wątroby
- choroby przewodu pokarmowego
- niedożywienie
- nieprawidłowości chromosomalne
- stosowanie niektórych leków

Hipoglikemia noworodków - badania laboratoryjne

- stężenie glukozy w osoczu krwi – to najistotniejsze badanie w diagnostyce hipoglikemii
- powinno być wykonane w czasie epizodu hipoglikemii (jeżeli są objawy)
- pomiary niskich stężeń glukozy za pomocą niektórych glukometrów nie są wiarygodne (konieczna ocena w laboratorium!!!)

Diagnostyka hiperamonemii noworodkowej

- stan zagrażający życiu noworodka (neurotoksyczność)
- w warunkach fizjologicznych amoniak występuje jako jon amonowy w mniejszym stopniu przepuszczalny przez błony komórkowe
- w alkalozie równowaga przesunięta w stronę amoniaku

Diagnostyka hiperamonemii noworodkowej

- hiperamonemia może być przejściowa
- poważne zaburzenie gdy:
  - defekt enzymów cyklu mocznikowego
  - kwasice organiczne
  - niewydolność wątroby
  - infekcje dróg moczowych
  - sepsa,
  - żywienie pozajelitowe

Diagnostyka hiperamonemii noworodkowej

- stężenie amoniaku w osoczu krwi
- bardzo ważne warunki przedanalityczne!!!
- krew pobrana na EDTA, mała probówka, szczelnie zamknięta
- transportować w lodzie do laboratorium
- wirowanie, a następnie oznaczanie wykonać w ciągu 30 min.
- potwierdzenie wysokiego stężenie w próbce z drugiego pobrania
- nieprzestrzeganie zaleceń - ryzyko wyników fałszywie dodatnich!!!

Diagnostyka hiperamonemii noworodkowej

- niemowlęta i dzieci < 40 µmol/L
- noworodki urodzone o czasie <100 µmol/L
- wcześniaki <150 µmol/L
- schorzenia metaboliczne gdy amoniak > 200 µmol/L

Diagnostyka różnicowa hipokalcemii

- stężenie wapnia u płodu 2,5-2,75 mmol/L (10-11 mg/dL)
- spadek stężenia wapnia w 12-24 h życia dziecka
- obniżenia wapnia u zdrowych urodzonych o czasie dzieci do 1,88-2,12 mmol/L (7,5-8,5 mg/dL)
- prawidłowy poziom wapnia w 3 dniu życia noworodka (wzrost poziomu PTH)
- jelitowa absorbcja i nerkowa regulacja - dojrzałość w 2-4 tyg. życia

Diagnostyka różnicowa hipokalcemii

- noworodkowa hipokalcemia w 3-5 dniu życia wynika z nadmiernej podaży fosforanów (karmienie mlekiem krowim, mieszankami na bazie mleka krowiego)
- hipokalcemia gdy Ca całk <1,75 mmol/L (7 mg/dL) lub Ca zjonizow. < 1,0 mmol/L (4 mg/dL) u wcześniaków
- u dzieci urodzonych o czasie Ca całk. < 2,0 mmol/L, Ca zjonizow. < 1,2 mmol/L

Diagnostyka różnicowa hipokalcemii

- zależność między stężeniem wapnia całkowitego oraz zjonizowanego nie zawsze liniowa!!!
- powód: niskie stężenie albuminy, zaburzenia równowagi kwasowo-zasadowej (częste u wcześniaków i chorych dzieci)
- alkaloza - obniżenie stężenia Ca zjonizowanego
- niska albumina - obniżenie stężenia Ca całkowitego (Ca zjonizowane prawidłowe)
- Ca całk. obniża się o 0,02 mmol/L na każdy 1 g/dL spadku stężenia albuminy

Laboratoryjna diagnostyka infekcji dróg moczowych

- nieprawidłowa analiza moczu u 1-14% zdrowych dzieci w wieku szkolnym
- leukocyturia - prawdopodobieństwo infekcji dróg moczowych
- test paskowy dodatni na esterazę leukocytów (wynik fałszywie ujemny gdy mocz zagęszczony)

Laboratoryjna diagnostyka infekcji dróg moczowych

- liczba leukocytów 5-10/ml w moczu - wynik dodatni u chłopców <3 lat, 20-50/ml - wynik dodatni u dziewczynek, >50/ml - jednoznacznie dodatni
- wykazanie leukocyturii z nitriturią - infekcja dróg moczowych (czułość 93%)
- dodatnia reakcja na azotyny (wynik ujemny nie wyklucza infekcji, test mało czuły u niemowląt)

Ocena funkcji nerek u dzieci

- rutynowa diagnostyka chorób nerek - oznaczenie kreatyniny (u dzieci >2 r.ż. można oznaczać poziom cystatyny C)
- klasyfikacja przewlekłej choroby nerek - eGFR obliczane ze wzorów
- trudna interpretacja wyników kreatyniny u dzieci (wzrost masy mięśniowej u dzieci powyżej 2 r.ż.)
- hemoliza, hiperbilirubinemia interferują z metodami oznaczania kreatyniny (zaniżanie wyniku)
- poziom kreatyniny może się zmieniać niezależnie od GFR (zwiększona podaż mięsa, niedożywienie, atrofia mięśni, choroby wątroby)

Ocena funkcji nerek u dzieci

- nie da się bezpośrednio zmierzyć GFR
- GFR określa się na podstawie klirensu substancji usuwanej przez nerki
- eGFR wyliczane na podstawie wzoru Schwartza (stężenie kreatyniny w surowicy krwi i wzrost dziecka) - przydatny dla dzieci z przewlekłą chorobą nerek od postaci łagodnej do ciężkiej

Ocena funkcji nerek u dzieci

- wzór Schwartza

eGFR (ml/min/1,73 m^2) = 0,41 x wzrost [cm]/ kreatynina [mg/dl]

Diagnostyka celiakii

- rozpoznanie choroby trzewnej opiera się na:
  - **kryteriach klinicznych**
  - **histopatologicznych**
  - **serologicznych**
- istotnym elementem postępowania diagnostycznego są także
  badania genetyczne



Badania serologiczne w diagnostyce celiakii

- przeciwciała przeciw czynnikowi zewnętrznemu wywołującemu celiakię

- przeciwciała przeciw gliadynie (AGA), obecnie przeciwko deamidowanej gliadynie (DGP)

- autoprzeciwciała

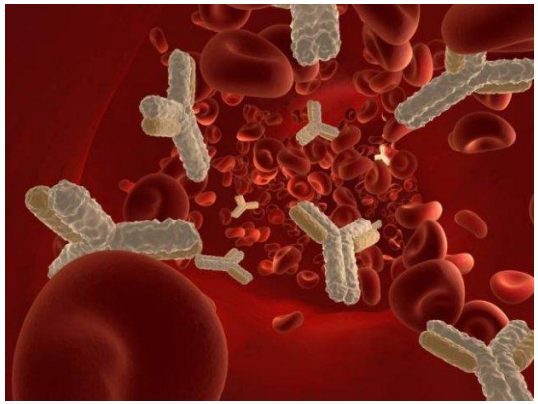
- p-ciała przeciwko endomyzjum (EMA) w kl. IgA oraz IgG

- p-ciała przeciw transglutaminazie tkankowej (tTG) w kl. IgA oraz IgG

Badania serologiczne w diagnostyce celiakii

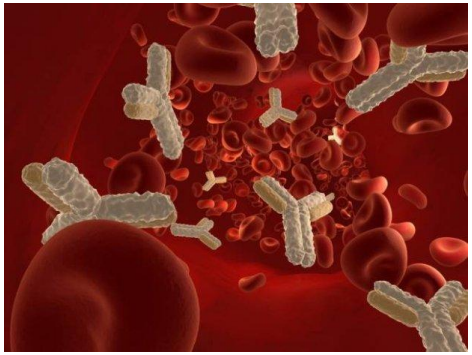
Wskazania do wykonania badań przeciwciał

- badania przesiewowe u chorych z podejrzeniem celiakii
- badania przesiewowe w grupach zwiększonego ryzyka
- ocena przestrzegania diety bezglutenowej



Badania serologiczne w diagnostyce celiakii

- zgodnie z aktualnymi zaleceniami ESPGHAN zaleca się w pierwszej kolejności wykonanie oznaczenia
  tTG w klasie IgA
  oraz ocenę stężenia przeciwciał IgA



Badania serologiczne w diagnostyce celiakii

- **przeciwciała endomyzjalne** - badanie weryfikujące (wykonywać również w przypadku niejednoznacznych wyników badania przeciwciał przeciwko tTG)

- jeżeli u pacjenta stwierdzono niedobór przeciwciał w klasie IgA oznaczać **tTG i EMA w klasie IgG**

- oznaczenie anty-DGP u pacjentów z objawami klinicznymi, u których inne przeciwciała typowe dla celiakii są ujemne (szczególnie u dzieci < 2 r.ż.)

Diagnostyka celiakii u dzieci

- celiakia u dzieci może być prawidłowo zdiagnozowana bez standardowego wykonywania biopsji jelita cienkiego, jeśli spełnione są jednocześnie dwa warunki:

1. poziom przeciwciał tTG IgA musi co najmniej **10-krotnie przewyższać górną granicę normy laboratoryjnej**
2. w innej niezależnej próbce krwi dziecka musi wyjść **pozytywny wynik przeciwciał EmA IgA**

Diagnostyce celiakii u dzieci

- w nowych rekomendacjach ESPGHAN (2020 r.) naukowcy podkreślają, że dla stwierdzenia celiakii u dzieci **nie jest już potrzebna obecność typowych objawów choroby ani genów HLA DQ2/DQ8**, jeśli pacjent spełnia wszystkie wyżej opisane kryteria prawidłowej diagnostyki serologicznej bez biopsji.

Diagnostyce celiakii u dzieci

- jest to znacząca zmiana w stosunku do poprzednich zaleceń, a wynika z faktu, że objawy celiakii mogą być bardzo skąpe lub nietypowe, a nawet wcale nie występować, natomiast wspomniany zestaw genów posiada około 30% populacji.
  - testy genetyczne HLA nadal mogą być stosowane, **wyłącznie dla stwierdzenia bardzo niskiego ryzyka wystąpienia celiakii**

(co istotne, naukowcy podkreślają, że negatywny wynik badania genetycznego nie wyklucza celiakii w 100%, a jedynie z bardzo dużym prawdopodobieństwem)

Badania genetyczne w diagnostyce celiakii

- rozwój choroby trzewnej warunkują allele II klasy układu HLA kodujące antygeny **HLA-DQ2 lub HLA-DQ8**

HLA allel	Chorzy na celiakię
DQ2	90-95%
DQ8	5-10%
Brak HLA DQ2/DQ8 = niskie ryzyko rozwoju celiakii < 1%	

Badania genetyczne w diagnostyce celiakii

- u prawie wszystkich chorych na chorobę trzewną stwierdza się obecność HLA DQ2 i/lub DQ8

  - występowanie genów HLA DQ2 i DQ8 **w populacji zdrowych szacuje się na ok. 30%**

Badania genetyczne w diagnostyce celiakii

- badanie genetyczne HLA DQ2 i DQ8 cechuje się wysoką ujemną wartością predykcyjną (NPV)
i służy przede wszystkim
do wykluczenia rozpoznania choroby trzewnej

- **NPV** prawdopodobieństwo, że osobnik nie ma choroby jeśli ma negatywny wynik testu
- **PPV** prawdopodobieństwo, że osobnik ma chorobę jeśli ma dodatni wynik testu

Markery stanu zapalnego

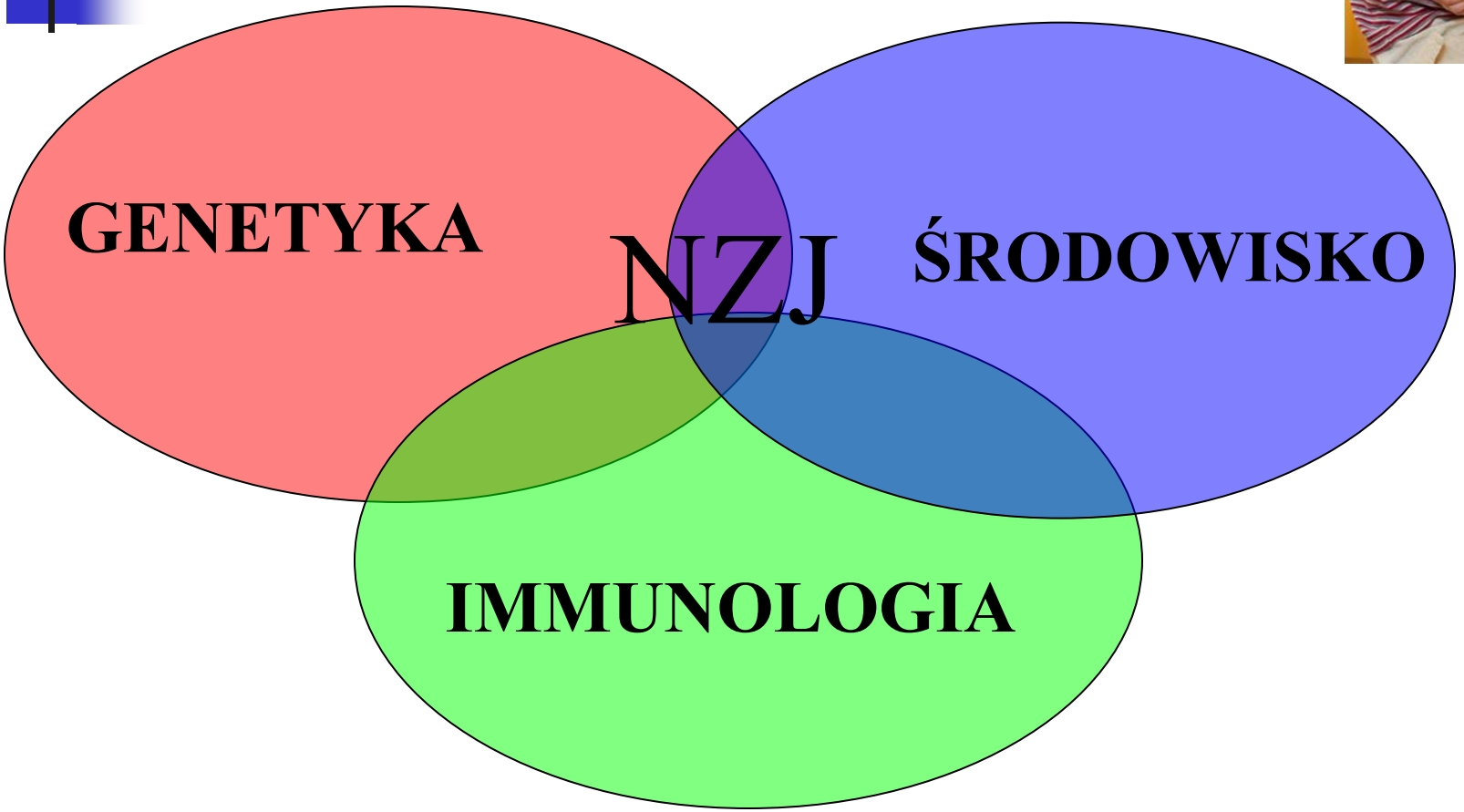
- **CRP>80 mg/l oraz PCT>2ng/ml -** infekcja
- **CRP<20 mg/l oraz PCT<0,5 ng/ml -** wykluczenie ciężkiej infekcji

Znaczenie PCT w diagnostyce infekcji u noworodków

- przebieg infekcji u noworodków może być dramatycznie szybki - od miejscowej do uogólnionej sepsy
- wraz z progresją infekcji wzrasta PCT (w pierwszych dwóch dniach życia noworodka PCT podwyższone)
- PCT bardziej czułe badanie niż liczba WBC, PLT, CRP
- chociaż….. CRP ma dużą wartość diagnostyczną u noworodków z infekcją (oznaczać 3-krotnie w odstępach 12-godz., wartości ujemne - brak infekcji).

Nieswoiste zapalenia jelit





Rozpoznanie NZJ

- objawy kliniczne
- **wyniki badań laboratoryjnych krwi i kału**
- obraz endoskopowy, radiologiczny i ultrasonograficzny
- ocena mikroskopowa (histopatologiczna) wycinków jelita

Diagnostyka laboratoryjna NZJ

- nie jest wystarczająca do postawienia diagnozy
- prawidłowe wyniki nie wykluczają fazy aktywnej choroby
- u wszystkich chorych z nowo rozpoznanym NZJ lub zaostrzeniem objawów klinicznych diagnostyka w kierunku:
  - *Shigella*
  - *Salmonella*
  - *Campylobacter*
  - *Escherichia Coli*
  - *Clostridium difficile*

Diagnostyka laboratoryjna NZJ

Badanie krwi

- badania hematologiczna (Hb, WBC, PLT, OB)
- badania biochemiczne (CRP, transaminazy, amylaza, mocznik, kreatynina, proteinogram, Ca, Mg, elektrolity)
  - przeciwciała ANCA, ASCA
- badania w kierunku pełzakowicy, zakażenia węgorkiem jelitowym, motylicą wątrobową, HIV

Diagnostyka laboratoryjna NZJ

Aktywna faza choroby

- granulozytoza
- podwyższona liczba płytek
- niekiedy eozynofilia
- umiarkowany wzrost enzymów wątrobowych

- BOF (CRP/orozomukoid) wiarygodny wskaźnik aktywności choroby

Diagnostyka laboratoryjna NZJ

- Przeciwciała ASCA - przeciwko oligomannozowym elementom ściany komórkowej grzybów *Saccharomyces cerevisiae*
- Przeciwciała ANCA - okołojądrowe przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilów

- **ASCA(+), ANCA(-) - ch. L-C (41-76%),** 5% ch. WZJG
- **ASCA(-), ANCA(+) - WZJG (60-80%),** 25% ch. L-C

Diagnostyka laboratoryjna NZJ

Badanie stolca

- krew utajona w kale - wykluczenie zakażenia bakteryjnego lub pasożytniczego
  - pH, substancje redukujące - wykluczenie nietolerancji pokarmowej

Diagnostyka laboratoryjna NZJ

Kalprotektyna

- **marker procesu zapalnego toczącego się w jelicie**
- wydzielana przez granulocyty obojętnochłonne, monocyty, makrofagi
  - ma właściwości przeciwbakteryjne, proapoptotyczne
    - oporna na działanie bakterii jelitowych

Diagnostyka laboratoryjna NZJ

Kalprotektyna

- stabilna do 7 dni w temperaturze pokojowej
- przydatna w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu NZJ
- jej stężenie w kale koreluje ze stopniem aktywności choroby (wysoka czułość i swoistość!!!)

Diagnostyka laboratoryjna NZJ

Kalprotektyna u dzieci

- do 1 r.ż stężenie wyższe w porównaniu z dziećmi starszymi
  - stężenie nie zależy od wieku ciążowego, masy urodzeniowej dziecka
- u dzieci karmionych piersią stężenie wyższe w porównaniu z dziećmi karmionymi sztucznie

Test do ilościowego oznaczana kalprotektyny

Wiek	Mediana kalprotektyny [mg/kg]*
0-3 m-cy	345 (195-621)
3-6 m-cy	278 (85-988)
6-12 m-cy	183 (109-418)
1-4 lat	75 (53-119)
4-12 lat	28 (25-35)

* Hestvik E et al. (2011) BMC Pediatrics 11:9 doi: 10.1186/1471-2431-11-9

Wartości referencyjne u zdrowych dorosłych ≈ 25 mg/kg
>50 mg/kg - proces zapalny (dzieci>4 r.ż. oraz dorośli)

Perspektywy diagnostyki laboratoryjnej NZJ

- *Laktoferyna w kale ???*
- *Białko S100A12 (kalgranulina C, EN-RAGE) w kale ???*

……..

-medycyna personalizowana – biomarkery – określanie ryzyka choroby (zapobieganie), wczesne wykrywanie przedkliniczne (aktywność proteolityczna w stolcu i dysbioza), prognozowanie długoterminowej aktywności choroby przy rozpoznaniu (profile ekspresji genów i metylacji, np. geny *CLEC5A/CDH2* – 20x większe ryzyko eskalacji leczenia w ciągu 3-4 lat),

Perspektywy diagnostyki laboratoryjnej NZJ

- metylacja *TAP1,* profil wyczerpania komórek T „PredictImmune”),
- określanie podtypów molekularnych choroby (np. profile ekspresji IL-13),
- najnowszy nurt w biomarkerach: prognozowanie odpowiedzi na leki biologiczne
- w samym 2022 roku ponad 100 badań nowych biomarkerów

Ocena czynności zewnątrzwydzielniczej trzustki

ocena wydalania tłuszczów w kale (*badanie mikroskopowe*? - lepsze badanie ilościowe?)

- wskaźnik reabsorbcji tłuszczu (dzieci do 6 m-ca - >85%, dzieci starsze - 93-95%, dzieci z CF najczęściej <50%))
- kwaśny steatokryt (stosunek tłuszczu w stolcu do całkowitej ilości stolca)
- bilans izotopów w stolcu (mieszanina znakowanych ^{13}C triglicerydów)
- elastaza-1 w kale (norma >200 µg/g, niewydolność trzustki <100 µg/g) - metoda ilościowa (ELISA) lub szybki test

Test do szybkiego oznaczana elastazy-1 w kale

Wskazania

- różnicowanie/wykluczenie udziału dysfunkcji trzustki przy zaburzeniach układu pokarmowego, bólu jamy brzusznej, niestrawnościach, zespole jelita nadwrażliwego, NZJ
- rozpoznanie/wykluczenie zewnątrzwydzielniczej niewydolności trzustki spowodowanej np. PZT, cukrzycą, kamicą żółciową, mukowiscydozą, nowotworami trzustki, celiakią

Test do szybkiego oznaczana elastazy-1 w kale

Zalety

- elastaza trzustkowa nie ulega degradacji w przewodzie pokarmowym i jest swoista dla trzustki
- test oparty o przeciwciała monoklonalne
- wysoka specyficzność - 93% oraz czułość - 93%
- łatwy do wykonania

Choroby nowotworowe w pediatrii

- białaczki
- chłoniaki
- nowotwory ośrodkowego układu nerwowego

- diagnostyka guzów litych u dzieci
  - AFP (guzy zarodkowe)
  - hCG (guzy zarodkowe)
  - LDH (guzy zarodkowe, nowotwory limfatyczne, białaczki, różna lokalizacja narządowa, przerzuty do wątroby)
  - CA-125 (guzy jajnika)
  - NSE (neuroblastoma, glejaki)

Choroby nowotworowe w pediatrii

- Neuroblastoma (nerwiak zarodkowy)

- wywodzi się z układu współczulnego, co tłumaczy ich aktywnością hormonalną (aminy katecholowe)
- diagnostyka biochemiczna

* dobowe wydalanie:
  - amin katecholowych (A, NA)
  - dopaminy (w stosunku do kreatyniny)
  - kwas wanilinomigdałowy (VMA) (w stosunku do kreatyniny)
  - kwas homowanilinowy (HVA) (w stosunku do kreatyniny)

Mocz zbiera się na 6M HCl (10 ml kwasu na 1000 ml moczu)!!!

Guzy zarodkowe jądra i jajników

- AFP (u dzieci >2 r.ż. nie przekracza 10 ng/ml), u małych dzieci w przypadku różnego rodzaju guzów może osiągać wartość 2 500 000 ng/ml
- nienasieniakowe nowotwory jądra - wzrost AFP
- nasieniaki - AFP niskie
- β-hCG
- LDH