

Strokovni prispevek/Professional article

OCENA PRIMARNE HEMOSTAZE Z ANALIZATORJEM TROMBOCITNE FUNKCIJE PFA-100

EVALUATION OF PRIMARY HAEMOSTASIS WITH PLATELET FUNCTION ANALYSER PFA-10

Uroš Mlakar, Irena Preložnik-Zupan, Rika Strauch

Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 2003-11-27, sprejeto 2004-04-02; ZDRAV VESTN 2004; 73: 485-8

Ključne besede: trombocitna funkcija; zapiralni čas; čas krvavitve

Key words: platelet function; closure time; bleeding time

Izvleček – Izhodišča. Za laboratorijsko diagnostiko motnje primarne hemostaze se odločimo pri nagnjenosti k podplutbam, pri pogostih krvavitvah iz nosu, menoragiji ali pooperativni krvavitvi, zlasti po izruvanju zob ali tonzilektomiji. Običajno se za ugotavljanje motenj v primarni hemostazi uporabljajo čas krvavitve (ČK), merjenje von Willebrandovega faktorja (vWF) in agregometrija. Kot presejalni test za ugotavljanje motnje primarne hemostaze se je do nedavnega uporabljal predvsem ČK. Občutljivost testa za ugotavljanje motnje funkcije trombocitov in ponovljivost testa je slaba. Uvedba merjenja zapiralnega časa (ZČ) z analizatorjem PFA-100 odpravlja mnoge slabosti, ki spremljajo določanje ČK. Z ZČ merimo nastanek trombocitnega strdka, ki zamaši odprtino v membrani, skozi katero teče kri. Strdek nastane zaradi delovanja velikih strižnih sil na trombocite in prisotnih agonistov na membrani. Uporabi se lahko testna celica, ki ima na membrani kolagen in adrenalin in/ali celica s kolagenom in ADP. Analizator izmeri čas, ki je potreben, da nastali trombocitni strdek ustavi pretok krvi skozi membrano.

Abstract – Background. Laboratory evaluation is indicated when a disorder of primary haemostasis is suspected by a personal or family history of easy bruising, nose bleeds, menorrhagia or postoperative bleeding, especially following dental extraction or tonsillectomy. The traditional procedures to diagnose defect in primary haemostasis are bleeding time, measurement of von Willebrand factor and platelet aggregation. The most widely used screening test is bleeding time. Despite attempts at standardisation, the bleeding time remains poorly reproducible and is relatively insensitive to platelet function defects. Recently, a new test method, the platelet function analyser (PFA-100) has been introduced for the investigation of primary haemostasis. PFA-100 measures the ability of platelets activated in a high-shear environment to occlude an aperture in membrane treated with collagen and epinephrine and/or collagen and ADP. The time taken for flow across the membrane to stop (closure time) is recorded.

Zaključki. V članku obravnavamo prednosti in omejitve klinične uporabe analizatorja PFA-100. Zaradi enostavne izvedbe in dobre občutljivosti je ZČ primerna presejalna preiskava za ugotavljanje von Willebrandove bolezni, prirojjenih napak trombocitov in pridobljene okvare funkcije trombocitov zaradi bolezni in zdravil (acetilsalicilna kislina). Test lahko uporabljamo tudi za vodenje zdravljenja von Willebrandove bolezni z dezmpresinom. Omogoča tudi spremljanje zdravljenja z antiagregacijskimi zdravili.

Conclusions. This article highlights the benefits and limitations of the clinical utility of the PFA-100. Because of its simplicity and excellent sensitivity the PFA-100 is useful mainly as a screening test for von Willebrand disease, hereditary and acquired platelet-dysfunctions including acetylsalicylic acid-induced abnormalities. Recently the PFA-100 has been shown to be of value in monitoring antiplatelet therapy and in monitoring desmopressin treatment in von Willebrand disease.

Uvod

Motnja v primarni hemostazi lahko nastane zaradi napake v žilni steni, trombocitopenije ali zaradi motene funkcije trombocitov. Slednja je lahko posledica okvare trombocitov ali spremembe v plazmi, npr. pomanjkanja von Willebrandovega faktorja (vWF) ali fibrinogena. Običajno razlikujemo prirojene od pridobljenih motenj funkcije trombocitov. Najpogostejša prirojena motnja je von Willebrandova bolezen (vWb), ki je posledica pomanjkanja ali spremenjene zgradbe vWF. Prirojene okvare trombocitov so redke. Sem sodijo Ber-

nard-Soulierov sindrom (napaka GP Ib/IX), Glanzmannova trombastenija (napaka GP IIb/IIIa) in napaka v uskladičenju agonistov (storage pool disease). Pridobljene motnje so pogoste. Lahko jih razdelimo v tri skupine: motnje pri sistemskih boleznih, med katerimi je pomembna ledvična odpoved z uremijo in jetrne bolezni, motnje pri krvnih boleznih, kot so mieloproliferativne bolezni, monoklonska imunoglobulinemija in mielodisplastični sindrom, ter motnje zaradi učinka različnih zdravil (nesteroidna protivnetna zdravila, nekateri antibiotiki, antiagregacijska zdravila).

Običajno se za ugotavljanje motenj v primarni hemostazi uporabljajo čas krvavitve (ČK), merjenje vWF in agregometrija. S ČK po Ivyu merimo čas do ustavitve krvavitve po standardni zarezi kože na volarni strani podlakti. ČK se uporablja kot presejalni test za ugotavljanje motnje primarne hemostaze. Test ima vrsto pomanjkljivosti: je odvisen od izkušenj izvajalca, lahko je normalen pri pomembnih motnjah primarne hemostaze, nima predoperativne napovedne vrednosti glede krvavitve, je neprijeten za bolnika in neprimeren za večkratno uporabo zaradi nastanka brazgotin, je odvisen od kakovosti kože, izvedba testa zahteva precej časa, ne omogoča razlikovanja različnih vzrokov za motnjo primarne hemostaze. Posledica je velika variabilnost rezultatov in slaba ponovljivost metode (1-3).

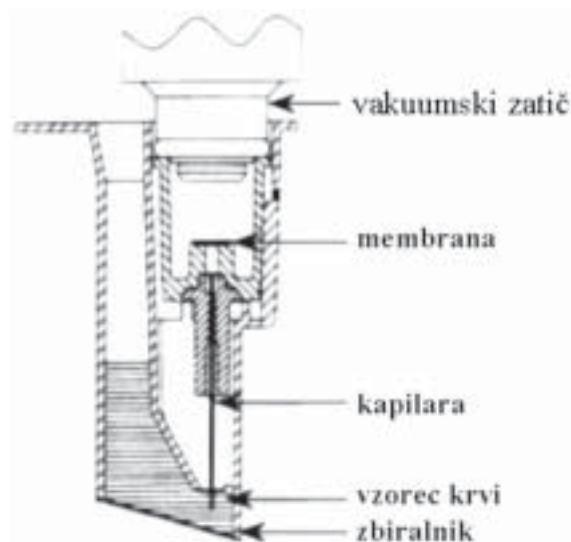
Čeprav je agregometrija bolj občutljiva preiskava trombocitne funkcije kot ČK, se ne uporablja za presejalne namene, ker je zahtevna, dolgotrajna in draga. Uporablja se predvsem za opredelitev vzroka motene funkcije trombocitov (4).

Merjenje zapiralnega časa z analizatorjem PFA-100

Uvedba merjenja zapiralnega časa (ZČ) z analizatorjem PFA-100 (Dade Behring, Marburg, Germany) odpravlja mnoge slabosti časa krvavitve. Preiskava poteka in vitro v nadzorovanih pogojih, ki do neke mere posnemajo nastanek trombocitnega strdka in vivo (4-6). Analizator PFA-100 je sorazmerno nov testni sistem za oceno primarne hemostaze. Po svetu se je uveljavil po letu 1997, ko je njegovo uporabo v ZDA dovolil Urad za hrano in zdravila.

Opis metode

PFA-100 posnema razmere v majhnih arterijah pri poškodbi. Merilno celico za enkratno uporabo v analizatorju sestavlja: zbiralnik za vzorec, kapilara in biološko aktivna membrana z odprtino premera 150 μ m na sredini (Sl. 1). Na razpolago sta dve vrsti merilnih celic. V prvi je membrana, obložena z živalskim kolagenom tipa 1 in adrenalinom (merilna celica - kolagen/adrenalin), v drugi pa je poleg kolagena še adenzin-5'-difosfat (merilna celica - kolagen/ADP). Naprava poseja kri skozi kapilaro in odprtino v membrani ter izpostavi trombocite podobnim strižnim silam in pretoku kot v žili. S kolagenom prekrita membrana posnema razmere, ki so enake kot pri poškodbi žile. Zaradi stika s kolagenom in adrenalinom oziroma ADP pride do adhezije in agregacije trombocitov. Narasčajoči trombocitni strdek upočasni pretok skozi odprtino v membrani. Pretok se ustavi, ko strdek popolnoma zamaši odprtino. Merimo čas, ki je potreben, da nastali trombocitni čep zapre odprtino v membrani in s tem prekine tok krvi. Tako izmerjeni zapiralni čas izrazimo v sekundah. Meritev je prekinjena, če trombocitni strdek ne nastane v 300 sekundah, če je pretok skozi kapilaro moten zaradi trombocitnih agregatov ali mehurčkov zraka in če je vzorec premajhen (predčasna izpraznitve). Za testiranje uporabimo polno kri, ki ji je ob odvzemu dodan natrijev citrat. Preiskavo je potrebno opraviti znotraj 0,5-4 h po odvzemu krvi (7). Poleg funkcije trombocitov lahko vplivajo na ZČ še sledeči dejavniki: število trombocitov, hematokrit in aktivnost vWF. Vpliv fibrinogena v plazmi na ZČ ni pomemben, saj pride do manjšega podaljšanja ZČ le pri bolnikih s prirojeno afibrinogenemijo (8). Na zapiralni čas vpliva tudi koncentracija natrijevega citrata v epruveti. Pri večji koncentraciji je ZČ daljši (9). V literaturi so pogosto navedene normalne vrednosti ZČ, izmerjene z višjo koncentracijo natrijevega citrata (129 mmol/l), kot se uporablja pri nas (4, 10). Zato smo izračunali lastne normalne vrednosti za merilni celici kolagen/adrenalin in kolagen/ADP.



Sl. 1. Merilna celica v analizatorju trombocitne funkcije (PFA-100).

Figure 1. Platelet function analyser (PFA-100) test cartridge.

Normalne vrednosti zapiralnega časa

Za izračun normalnih (referenčnih) vrednosti smo določili ZČ pri 120 zdravih prostovoljcih. Starost preiskovancev je bila 20-73 let (mediana 33 let). Med njimi je bilo 56% žensk. Za določitev ZČ smo uporabili epruvete, ki vsebujejo 105 mmol/l (3,2%) puferirano raztopino natrijevega citrata. Razmerje med krvjo in natrijevim citratom je bilo 1:10. Spodnjo in zgornjo referenčno vrednost smo dobili z določitvijo 2,5 in 97,5 percentila. Za merilno celico kolagen/adrenalin sta bili ti mejni vrednosti 83 in 157 s, za merilno celico kolagen/ADP pa 65 in 119 s. Interval zaupanja (90%) za navedene mejne referenčne vrednosti je bil pri prvi merilni celici 77-89 s in 155-161 s, pri drugi merilni celici pa 64-67 s in 114-159 s. Vrednosti so povsem v območju tistih, ki jih navaja tudi literatura (11-13).

Klinična uporabnost določanja zapiralnega časa

Na motnjo primarne hemostaze pomislimo pri podatkih o nagnjenosti k podplutbam, krvavitvi iz nosu, menoragiji ali pooperativni krvavitvi, zlasti po izdrtju zob ali tonzilektomiji. Tako kot vsi laboratorijski testi za oceno primarne hemostaze tudi ZČ ne nadomešča, temveč dopolnjuje anamnezo in klinični pregled. Ugotovili so, da je ZČ bolj občutljiva preiskava kot čas krvavitve (ČK). Ko so z agregometrijo ugotavljali vzroke za neskladanja med ZČ in ČK, so ugotovili, da je bil v 86% vzrok lažni izsledek ČK (14). Zato se ocenjuje, da je ZČ primeren presejalni test pri sumu za vWb in druge prirojene in pridobljene okvare trombocitne funkcije (11-13). Pred tem je potrebno izključiti trombocitopenijo (štev. trombocitov < 100 $\times 10^9/l$) in anemijo (hematokrit < 0,35) (8, 15-17). Občutljivost metode je po podatkih iz literature za vWb 90-100% z izjemo tipa 2N bolezn. Za Glanzmannovo trombastenijo in Bernard-Soulierov sindrom je občutljivost po podatkih 100% (11-13). Tudi specifičnost metode je po podatkih preko 95% za obe merilni celici (18).

Razlaga podaljšanega ZČ

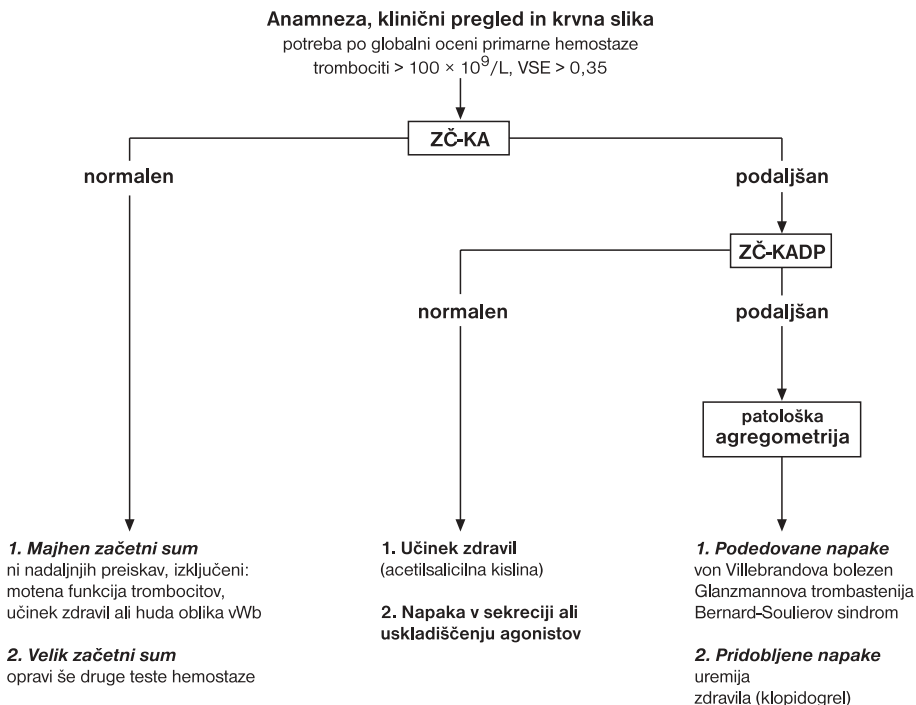
Če je podaljšan ZČ kolagen/adrenalin in normalen ZČ kolagen/ADP, je najverjetnejši vzrok uživanje acetilsalicilne kisline ali podobnih zdravil (nesteroidna protivnetna zdravila) (11,

13). ZČ kolagen/adrenalin je zelo občutljiv za acetilsalicilno kislino, kolagen/ADP pa je nanjo sorazmerno neobčutljiv (19–21). Če bolnik zanika uživanje acetilsalicilne kisline, poskušamo pojasniti motnjo z agregometrijo. Podoben učinek na ZČ imata tudi napaka v skladiščenju in motnja v sproščanju (sekreciji) agonistov. To motnjo ločimo od učinka acetilsalicilne kisline z agregometrijo in drugimi preiskavami (Sl. 2).

v plazmi (23). Preiskavo moti tudi hemoliza, ker povzroči sproščanje ADP in zniža hematokrit. Zato vzorce s hemolizirano krvjo zavržemo.

Zaključki

Merjenje ZČ je primerna presejalna preiskava za ugotavljanje von Willebrandove bolezni, prirojenih napak trombocitov in pridobljene okvare funkcije trombocitov zaradi bolezni (jetrne bolezni, uremija) in zdravil (acetilsalicilna kislina). Test se lahko uporablja tudi za vodenje zdravljenja von Willebrandove bolezni z dezmozpresinom (24). Omogoča tudi spremljanje zdravljenja z antiagregacijskimi zdravili (aspirin, tiklodipin, abciximab). Čeprav ZČ ni primeren za napoved tveganja za krvavitev pri kirurškem posegu, je smiselno napraviti to preiskavo pri bolnikih z visokim tveganjem. Na ta način lahko izključimo von Willebrandovo bolezen ali drugo motnjo funkcije trombocitov pri bolnikih, ki nimajo ustreznih anamnestičnih podatkov. Preiskava je koristna tudi pri ugotavljanju vzroka za krvavitve po operaciji na srcu. Če je zapiralni čas normalen, je manj verjetno, da je krvavitev posledica motene funkcije trombocitov zaradi uporabe zunajtelesnega obtoka ali zdravil. Bolj verjeten je kirurški vzrok krvavitve. ZČ je globalni test primarne hemostaze in kot tak ni specifičen oz. predvidljiv za neko določeno motnjo primarne hemostaze. Vendar se zaradi uporabe dveh merilnih celic (kolagen/adrenalin in kolagen/ADP) zoži število možnih vzrokov, kar olajša izbiro nadaljnjih bolj specifičnih preiskav.



Sl. 2. Predlagani algoritem za oceno primarnih motenj hemostaze z analizatorjem PFA-100 (ZČ-KA = zapiralni čas kolagen/adrenalin, ZČ-KADP = zapiralni čas kolagen/ADP).

Figure 2. A suggested approach to the investigation of potential disturbances of primary haemostasis utilizing the PFA-100 (ZČ-KA = closure time collagen/epinephrine, ZČ-KADP = closure time collagen/ADP).

Literatura

Najbolj pogosti vzroki za podaljšanje obeh ZČ so uremija, kar smo potrdili tudi z lastno študijo (22), hude žilne stenoze, napake zaklopke in von Willebrandova bolezen. Ker so prve tri možnosti običajno klinično očitne, se priporoča le potrditev von Willebrandove bolezni z agregometrijo in določitvijo koncentracije antigena vWF v plazmi (Sl. 2).

Prednosti in omejitve preiskave s PFA-100

Z analizatorjem PFA-100 je merjenje trombocitne funkcije preprosto, saj za delo z njim ne potrebujemo nobenega dodatnega izobraževanja ali uvajanja. V primerjavi s časom krvavitve in agregometrijo je merjenje ZČ hitrejše in zato primernejše za rutinsko ugotavljanje motenega delovanja trombocitov (14). Anemija in trombocitopenija podaljšata ZČ. To moramo upoštevati, če se odločimo za oceno trombocitne funkcije pri bolnikih s številom trombocitov pod $100 \times 10^9/L$ in hematokritom pod 0,35. Prav tako ni podatkov o normalnih vrednostih za vzorce s številom trombocitov nad $500 \times 10^9/L$ ali hematokritom nad 0,50. Meritev motijo lahko tudi mikrotrombi v vzorcu ali delci, vneseni v vzorec iz okolja. V teh primerih naprava prekine meritev zaradi motenega pretoka. Ker nekatera zdravila motijo delovanje trombocitov, so za vrednotenje zapiralnih časov pomembni tovrstni podatki. Skrajšanje ZČ lahko povzroči sistemsko vnetje zaradi porasta koncentracije VWF

- Marchant KK, Corcoran G. The laboratory diagnosis of platelet disorders. An algorithmic approach. Arch Pathol Lab Med 2002; 126: 133–46.
- Mattix H, Singh AK. Is the bleeding time predictive of bleeding prior to a percutaneous renal biopsy? Curr Opin Nephrol Hypertens 1999; 8: 715–8.
- Lehman CM, Blaylock RC, Alexander DP, Rodgers GM. Discontinuation of the bleeding time test without detectable adverse clinical impact. Clin Chem 2001; 47: 1204–11.
- Mammen EF, Comp PC, Gosselin R et al. PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction. Semin Thromb Hemost 1998; 24: 195–202.
- Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R et al. Description of an in-vitro platelet function analyser: PFA-100. Semin Thromb Hemost 1995; 21: Suppl 2: 106–12.
- Mammen EF, Alshameeri RS, Comp PC. Preliminary data from a field trial of the PFA-100 system. Semin Thromb Hemost 1995; 21: Suppl 2: 113–20.
- Wuillemin WA, Gasser KM, Zeerleder SS, Lammle B. Evaluation of platelet function analyser (PFA-100) in patients with a bleeding tendency. Swiss Med Wkly 2002; 132: 443–8.
- Harrison P, Robinson MSC, Mackie IJ et al. Performance of the platelet function analyser PFA-100 in testing abnormalities of primary haemostasis. Blood Coagul Fibrinolysis 1999; 10: 25–31.
- Heilmann JE, Kundu KS, Sio R et al. Comparison of four commercial citrate blood collection systems for platelet function analysis by the PFA-100™ system. Thromb Res 1997; 87: 159–64.
- Wuillemin WA, Gasser KM, Zeerleder SS, Lammle B. Evaluation of platelet function analyser (PFA-100) in patients with a bleeding tendency. Swiss Med Wkly 2002; 132: 443–8.
- Favaloro EJ. Utility of the PFA-100 for assessing bleeding disorders and monitoring therapy. A review of analytical variables, benefits and limitations. Hemophilia 2001; 7: 170–9.
- Favaloro EJ. Clinical application of the PFA-100. Curr Opin Hematol 2002; 9: 407–15.

13. Jilma B. Platelet function analyser (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. *J Lab Clin Med* 2001; 138: 152-63.
14. Francis J, Francis D, Larson L, Helms E, Garcia M. Can the platelet function analyser (PFA)-100 test substitute for the template bleeding time in routine clinical practice? *Platelets* 1999; 10: 132-6.
15. Escolar G, Cases A, Vinas M, Pino M, Calls J, Cirera I, Ordinas A. Evaluation of acquired platelet dysfunctions in uremic and cirrotic patients using the platelet function analyser (PFA-100™): influence of hematocrit elevation. *Haematologica* 1999; 84: 614-9.
16. Kottke-Marchant K, Powers JB, Brooks L, Kundu S, Christie DJ. The effect of antiplatelet drugs, heparin, and preanalytical variables on platelet function detected by the platelet function analyser (PFA-100). *Clin Appl Thromb Hemost* 1999; 5: 122-30.
17. Carcao MD, Blanchette VS, Stephens D et al. Assessment of thrombocytopenic disorders using the platelet function analyser (PFA-100). *Br J Haematol* 2002; 117: 961-4.
18. Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F et al. Screening for von Willebrand disease with a new analyser using high shear stress: a study of 60 cases. *Blood* 1998; 91: 1325-31.
19. Ortel TL, James AH, Thames EH et al. Assessment of primary hemostasis by PFA-100 analysis in a tertiary care center. *Thromb Haemost* 2000; 84: 93-7.
20. Von Pape K, Aland E, Bohner J. Platelet function analysis with PFA-100 in patients medicated with acetylsalicylic acid strongly depends on concentration of sodium citrate used for anticoagulation of blood sample. *Thromb Res* 2000; 98: 295-9.
21. Homoncik M, Jilma B, Hergovich N et al. Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyser PFA-100. *Thromb Haemost* 2000; 83: 316-21.
22. Zupan IP, Šabovič M, Salobir B, Ponikvar JB, Černelc P. Utility of in vitro closure time test for evaluating platelet-related primary hemostasis in dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 746-51.
23. Homoncik M, Blann AD, Hollenstein U, Prenerstorfer T, Eichler HG, Jilma B. Systemic inflammation increase shear stress-induced platelet plug formation measured by PFA-100. *Br J Haematol* 2000; 111: 1250-2.
24. Fressinaud E, Veyradier A, Sigaud M, Boyer-Neumann C, Le Boterff C, Meyer C. Therapeutic monitoring of von Willebrand disease: interest and limits of a platelet function analyser at high shear rates. *Br J Haematol* 1999; 106: 777-83.

V tej številki so sodelovali:

doc. dr. Rok Accetto, dr. med., specialist internist, Klinični oddelek za hipertenzijo, Bolnišnica Petra Držaja, Klinični center Ljubljana
 Alojzija Anderle, dr. med., specialistka ginekologinja in porodničarka, Zasebna ordinacija za ginekologijo in porodništvo, Radovljica
 Lara Beseničar, dr. med., specialistka ginekologinja in porodničarka, Služba za varstvo žena, Zdravstveni dom Nova Gorica
 Martina Bučar, dr. med., specialistka ginekologinja in porodničarka, Dispanzer za ženske, Zdravstveni dom Novo mesto
 doc. dr. Jurij Dobovišek, dr. med., specialist internist, Klinični oddelek za hipertenzijo, Bolnišnica Petra Držaja, Klinični center Ljubljana
 mag. Primož Dolenc, dr. med., specialist internist, Klinični oddelek za hipertenzijo, Bolnišnica Petra Držaja, Klinični center Ljubljana
 doc. dr. Srečo Dragoš, univ. dipl. sociolog, Fakulteta za socialno delo Ljubljana
 prof. dr. Jože Drinovec, dr. med., specialist internist, Krka d.d. Novo mesto, Ljubljana
 Cvetka Fakin, dr. med., specialistka ginekologinja in porodničarka, Dispanzer za ženske, Zdravstveni dom Trbovlje
 prim. Jurij Fürst, dr. med., Zavod RS za zdravstveno zavarovanje, Ljubljana
 prof. dr. Edvard Glaser, dr. med., specialist transfuziolog, Maribor
 prof. dr. Marija Gubina, dr. med., specialistka klinične mikrobiologije, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Ljubljana
 mag. Tine Hajdinjak, dr. med., specialist urolog, Oddelek za urologijo, Splošna bolnišnica Maribor
 doc. dr. Irena Hočvar-Boltežar, dr. med., specialistka otorinolaringologinja, Klinika za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo, Klinični center Ljubljana
 Nada Ivas, Inštitut za varovanje zdravja RS, Ljubljana
 Nevenka Kelšin, dr. med., specialistka socialne medicine, Inštitut za varovanje zdravja RS, Ljubljana
 Karel Kisner, dr. med., specialist urolog, Oddelek za urologijo, Splošna bolnišnica Maribor
 prof. dr. Nadja Kokalj-Vokač, dr. med., specialistka medicinske genetike, Oddelek za medicinsko genetiko, Splošna bolnišnica Maribor
 asist. Vilma Kovač, dr. med., specialistka ginekologinja in porodničarka, Služba za ginekologijo in perinatologijo, Splošna bolnišnica Maribor
 mag. Katarina Lenart, univ. dipl. kem., Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Klinični center Ljubljana
 prim. Bogdan Leskovic, dr. med., specialist internist, Ljubljana
 Vesna Levašič, dr. med., Ortopedska bolnišnica Valdoltra
 asist. Urška Lunder, dr. med., Zavod za razvoj paliativne oskrbe, Ljubljana

Danilo Maurič, dr. med., specialist ginekolog in porodničar, Dispanzer za ženske, Zdravstveni dom dr. Adolfa Drolca Maribor
 Meta Mencej, dr. med., Ljubljana
 dr. Ingrid Milošev, univ. dipl. ing., Ortopedska bolnišnica Valdoltra in Inštitut Jožef Stefan Ljubljana
 doc. dr. Uroš Mlakar, dr. med., specialist internist, Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center Ljubljana
 Dragoslav Mugoša, dr. med., specialist ginekolog in porodničar, Dispanzer za ženske, Zdravstveni dom Sežana
 asist. dr. Bojana Pinter, dr. med., specialistka ginekologinja in porodničarka, Ginekološka klinika, Klinični center Ljubljana
 Marjeta Podlipnik, dr. med., specialistka ginekologinja in porodničarka, Dispanzer za žene, Zdravstveni dom Kranj
 Janez Poles, dr. med., specialist internist, Bolnišnica Topolšica
 prof. dr. Pavel Poredoš, dr. med., specialist internist, Klinični oddelek za žilne bolezni, Klinični center Ljubljana
 asist. mag. Irena Preložnik-Zupan, dr. med., specialistka internistka, Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center Ljubljana
 prim. mag. Alenka Pretnar-Darovec, dr. med., specialistka ginekologinja in porodničarka, Ginekološka klinika, Klinični center Ljubljana
 asist. Mateja Rok-Simon, dr. med., specialistka socialne medicine, Inštitut za varovanje zdravja RS, Ljubljana
 Nives Rožič-Vičič, dr. med., specialistka ginekologinja in porodničarka, Dispanzer za ženske, Zdravstveni dom Izola
 mag. Barbara Salobir, dr. med., specialistka internistka, Klinični oddelek za hipertenzijo, Bolnišnica Petra Držaja, Klinični center Ljubljana
 mag. Tomaž Silvester, dr. med., specialist ortoped, Splošna bolnišnica Jesenice
 Tanja Soklič, dr. med., Klinika za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo, Klinični center Ljubljana
 Rika Strauch, štud. med., Ljubljana
 prim. mag. Marija Ana Šalehar, dr. med., specialistka šolske medicine, Ljubljana
 prim. mag. Jožica Šelb, dr. med., specialistka anesteziologije in reanimatologije, Inštitut za varovanje zdravja RS, Ljubljana
 mag. Zvonko Šoštarčič, dr. med., specialist ginekologije in porodništva, Ginekološki oddelek, Splošna bolnišnica dr. Franca Derganca, Šempeter pri Gorici
 doc. dr. Bojan Tepeš, dr. med., specialist internist-gastroenterolog, Zdravilišče Rogaška-Zdravstvo d.o.o., Rogaška Slatina
 mag. Martin Toth, dr. stom., Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije, Ljubljana
 dr. Ivan Verdenik, dipl. univ. ing. elektr., Ginekološka klinika, Klinični center Ljubljana
 mag. Boris Zagradišnik, dr. med., Oddelek za medicinsko genetiko, Splošna bolnišnica Maribor