

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

Dizertační práce

Praha, 2019

MUDr. Jan David

UNIVERZITA KARLOVA
3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Klinika dětí a dorostu



MUDr. Jan David

**Hodnocení efektivity celostátního celoplošného
novorozeneckého screeningu vzácných onemocnění
v České republice a hledání cest k jeho zlepšení**

*Evaluation of neonatal laboratory screening
efficacy in the Czech Republic and its improvements*

Dizertační práce

Praha, 2019

Autor práce: MUDr. Jan David

Studijní program: Preventivní medicína

Školitel: **doc. MUDr. Felix Votava, Ph.D.**

Pracoviště vedoucího práce: **Klinika dětí a dorostu 3. LF UK**

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Prohlašuji, že odevzdaná tištěná verze práce a verze elektronická nahraná do Studijního informačního systému (SIS 3. LF UK) jsou totožné.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20. 1. 2019

MUDr. JAN DAVID

Identifikační záznam

DAVID, Jan. Hodnocení efektivity celostátního celoplošného novorozeneckého screeningu vzácných onemocnění v České republice a hledání cest k jeho zlepšení. [Evaluation of neonatal laboratory screening efficacy in the Czech Republic and its improvements]. Praha, 2019. 81 stran, 4 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Klinika dětí a dorostu. Školitel doc. MUDr. Felix Votava, Ph.D.

Klíčová slova: novorozenecký screening, Česká republika, efektivita, epidemiologie, prevence

Keywords: *Neonatal Screening, Czech Republic, Efficacy, Epidemiology, Prevention*

OBSAH

ÚVOD	8
1. PŘEHLED PROBLEMATIKY	10
1.1 Novorozenecký screening	10
1.2 Vzácná onemocnění	13
1.3 Provedení novorozeneckého laboratorního screeningu v České republice	15
1.4 Nemoci vyhledávané v České republice	18
1.4.1 Dědičné poruchy metabolismu.....	19
1.4.2 Kongenitální hypotyreóza	23
1.4.3 Deficit 21-hydroxylázy	24
1.4.4 Cystická fibróza.....	25
2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	27
3. METODIKA	29
4. PUBLIKACE	31
4.1 Epidemiology of Rare Diseases Detected by Newborn Screening in the Czech Republic	32
4.1.1 Úvod k publikaci	32
4.1.2 Výsledky a diskuze.....	33
4.1.3 Závěr.....	36
4.2 Neonatal Screening in the Czech Republic: Increased Prevalence of Selected Diseases in Low Birthweight Neonates.....	38
4.2.1 Úvod k publikaci	38
4.2.2 Výsledky a diskuze.....	39
4.2.3 Závěr.....	41
4.3 Falešná pozitivita v novorozeneckém screeningu deficitu 21-hydroxylázy.....	42
4.3.1 Úvod k publikaci	42
4.3.2 Výsledky a diskuze.....	43
4.3.3 Závěr.....	45
4.4 Postup u pacienta s podezřením na deficit 21-hydroxylázy zachyceného v novorozeneckém screeningu v ČR	46
4.4.1 Úvod k publikaci	46
4.4.2 Výsledky a diskuze.....	47

4.4.3 Závěr.....	50
ZÁVĚRY	51
SOUHRN.....	53
PŘEHLED PUBLIKACÍ, PŘEDNÁŠEK A POSTERŮ	55
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	59
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	62
SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ	79
SEZNAM PŘÍLOH.....	81

ÚVOD

Pediatric, jako základní lékařský obor zabývající se zdravím a nemocemi jedince od narození (resp. v některých případech od fetálního období) až po dosažení dospělosti, se od ostatních medicínských směrů odlišuje zejména dvěma aspekty.

Prvním aspektem je, že předmětem oboru je rostoucí a vyvíjející se jedinec, který dramaticky rychle mění své fyziologické, patofyziologické i psychologické a sociální vlastnosti. Rovněž spektrum nemocí a poruch je věkově specifické, oproti např. adultnímu internímu lékařství se více uplatňují dědičné nemoci, vrozené vývojové vady, frekvence a spektrum infekčních nemocí je jiné. Z toho vyplývá základní paradigma pediatric, že dítě není „zmenšený dospělý“.

Druhým aspektem je akcentace významu prevence, což je reflektováno např. systémem novorozeneckého screeningu, povinných strukturovaných preventivních prohlídek či systému povinné vakcinace.

Prevenici lze definovat jako souhrn činností, které mají za cíl snížit počet nových onemocnění nebo zpomalit či zastavit vývoj choroby již existující (Kukla L., Průchová D. et al., 2016). Pro jednotlivce, populaci i zdravotnictví to přináší jednoznačný zdravotní i ekonomický benefit. Rozeznáváme prevenci primární, sekundární, terciární a kvartérní. Primární prevencí se rozumí zabránění vzniku nemoci, tedy snižuje její incidenci. Metody primární prevence zahrnují edukační činnost široké veřejnosti ohledně zdravého životního stylu a výživy, očkování proti infekčním nemocem apod. Sekundární prevence spočívá ve vyhledávání jedinců ještě v asymptomatické fázi nemoci (samovyšetřování, preventivní prohlídky u praktického lékaře či prenatalní a postnatální screening). Terciární prevence je zaměřena na pacienty v rozvinutém stádiu onemocnění se snahou redukovat komplikace a zabránit progresi nemoci, v dětském věku se uplatňuje zejména metodou dispenzarizace. Kvartérní prevence zabraňuje vzniku poškození pacienta při poskytování zdravotních služeb. Zde se uplatňují

tzv. Resortní bezpečnostní cíle či Systém hlášení nežádoucích událostí (Zdraví 2020, 2014).

Vysoce účinným nástrojem sekundární prevence a nedílnou součástí pediatrie je včasná detekce nemocných pomocí novorozeneckého laboratorního screeningu, který lze považovat zároveň i za efektivní řešení problematiky včasné diagnostiky a léčby tzv. vzácných onemocnění. Tato oblast vzácných onemocnění je ve fokusu evropské a národní zdravotnické legislativy.

Komentovaná verze předkládané dizertační práce se zabývá problematikou hodnocení novorozeneckého laboratorního screeningu v České republice a klade si za cíl tuto efektivitu vyhodnotit a zlepšit. Jedná se o velmi důležitý proces ke zlepšení fungování celého screeningového programu.

1. PŘEHLED PROBLEMATIKY

1.1 Novorozenecký screening

Pod pojmem novorozenecký screening lze v širším slova smyslu zahrnout první preventivní klinické vyšetření novorozence neonatologem či pediatrem s cílem pátrat po vrozených vývojových vadách či vrozených infekcích, ultrazvukové vyšetření při vyhledávání vývojové dysplázie kyčelní, oftalmoskopické vyšetření při vyhledávání kongenitální katarakty, vyšetření otoakustických emisí při vyhledávání vrozené hluchoty či ultrazvukové vyšetření ledvin k časnému zachytu vrozených vývojových vad ledvin a vývodných cest močových (Votava F., Kožich V. et al., 2014). V této práci je pozornost věnována jen novorozeneckému laboratornímu screeningu (NLS).

NLS je aktivní, v daném regionu celoplošné (většinou území státu), vyhledávání vrozených a/nebo dědičných nemocí či poruch v jejich časném preklinickém stádiu, tedy dříve, než se stačí klinicky projevit a nenávratně poškodit zdraví, či dokonce zapříčinit úmrtí (Therrell B., Padilla J. et al., 2015).

Za zakladatele NLS je považován prof. Robert Guthrie (1916–1995), který v roce 1965 ve Spojených státech amerických na Univerzitě v Buffalu ve státu New York jako první použil princip tzv. suché krevní kapky na filtračním papíru odebírané novorozencům z paty a zavedl tzv. bakteriálně inhibiční metodu k celoplošnému screeningovému programu pro detekci fenylketonurie. O tři roky později byly na žádost Světové zdravotnické organizace formulovány obecné principy screeningového programu (Wilson J., Jungner Y. et al., 1968), které NLS fenylketonurie zcela splňoval. Jedná se o deset obecných kritérií (Tab. 1).

S medicínským pokrokem a rozvojem technologií postupně screeningové programy expandovaly ve světě i u nás. S tímto rozšiřováním NLS však vznikaly problémy nejen odborné, ale i etické, ekonomické, geografické, legislativní a politické, které mohou být důvodem, proč původní Wilsonova a Jungnerova

kritéria (Tab. 1) jsou naplňována problematicky či relativizována (dále viz kapitola 4.1).

Tab. 1 Obecné principy screeningového programu

Vyhledávaná nemoc představuje významný zdravotní a sociální problém
Pro vyhledávanou nemoc existuje obecně uznávaná léčba
Ve screenované populaci jsou zajištěny podmínky pro diagnostiku a léčbu vyhledávané nemoci
Vyhledávaná nemoc má rozpoznatelnou časnou fázi
Pro vyhledávanou nemoc existuje obecně uznávaný screeningový test
Screeningový test je přijatelný pro většinu populace
Vyhledávaná nemoc je jasně definovaná, její patofyziologický průběh je znám
Existuje konsensus o tom, kdo má být léčen
Náklady jsou státem akceptovatelné
Vyhledávání pacientů je kontinuálním procesem

Zdroj: Wilson J., Jungner Y. et al., 1968

Do značné míry lze považovat počet nemocí vyhledávaných systémem NLS za ukazatel úrovně zdravotnictví daného státu. Výběr nemoci vhodné k zařazení do screeningového programu se stává složitější, je ovlivněn řadou faktorů a stále významnějšímu vlivu nabývá ekonomika a legislativa. Ani ve státech Evropské unie se nepodařilo dosáhnout počtu 50 nemocí screenovaných ve Spojených státech amerických, v evropských zemích se obvykle vyhledává mezi 5–30 nemocemi (Pešková K., Chrastina P. et al., 2018).

V minulosti proběhly i studie nemocí, u kterých se nakonec zařazení do NLS neukázalo jako vhodné, neboť nebyla naplněna již zmíněná Wilsonova a Jungnerova kritéria (Tab. 1). Zde lze uvést např. zvažovaný screeningový program deficitu alfa-1-antitrypsinu (Sveger T., Thelin T., 2000), kde výsledky ukázaly, že zavedení by bylo problematické a screeningový program by nepřinesl jasný benefit pro pacienty.

NLS je založen na stanovení koncentrace specifické látky (analytu) či průkazu genové mutace v kapce krve odebírané novorozencům na filtrační papír. Tento systém je tím efektivnější, čím větší část novorozenců regionu (většinou celého státu) je vyšetřena. Systém NLS nespočívá pouze v laboratorní analýze,

ale zahrnuje celou logistiku preanalytické části (informovaný souhlas rodičů, způsob, podmínky, časování a eventuální opakování odběrů suché kapky krve) a postanalytické části (postupy screeningových laboratoří při pozitivním či nejednoznačném nálezu, návaznost na klinická pracoviště s optimalizací dalšího diagnostického postupu a zabezpečení dlouhodobé léčby a sledování pacientů, vyhodnocování a zpracování dat screeningu, skladování a využití vzorků). Definice správných „lege artis“ postupů v preanalytické, analytické a postanalytické části k zajištění NLS jsou shrnuty v Metodickém návodu ve Věstníku Ministerstva zdravotnictví České republiky (MZ ČR), který byl naposledy aktualizován v červnu 2016 (Metodický návod k zajištění novorozeneckého laboratorního screeningu a následná péče, MZ ČR, 2016).

1.2 Vzácna onemocnění

Vzácná onemocnění („*Rare Diseases*“, RD) jsou definována populační frekvencí nižší než 1:2 000 (Richter T., Nestler-Parr S. et al., 2015). Jedná se o velmi heterogenní skupinu až 8 000 nozologických jednotek, do níž patří geneticky podmíněná onemocnění (až 80 %), metabolické poruchy, vzácné malignity dospělých a všechny malignity dětského věku. Tato onemocnění jsou chronická a progresivní, postihují rozdílné orgány a významně snižují kvalitu života pacientů. Řadu RD lze detekovat již v novorozeneckém věku, některé se mohou manifestovat až v průběhu dětství či v dospělosti. Diagnostika a terapie by měly probíhat ve specializovaných centrech. Většina RD je však obtížně léčitelná či nevléčitelná, což dokumentuje fakt, že až 30 % dětí s RD se nedožije pěti let (Kubáčková K., 2014).

Ačkoli jsou RD charakterizována nízkou prevalencí, odhaduje se, že v Evropě žije celkem cca 30 milionů těchto pacientů (www.vzacna-onemocneni.cz). Vyčíslit však skutečný výskyt jednotlivých nemocí patřících v dané populaci do RD je problematické, neboť stávající Mezinárodní klasifikace nemocí (MKN) jednotlivé nemoci ne zcela dostatečně reflektuje. Podle databáze Orphanet (www.orpha.net) má pouze 250 nozologických jednotek zařazených mezi RD přidělen kód v MKN. Proto je třeba, aby byla všechna RD vhodně reklasifikována a získala tak potřebnou viditelnost. Z tohoto pravidla se vymyká skupina RD detekovaných pomocí NLS, neboť všechna onemocnění vyhledávaná tímto systémem v ČR splňují definici RD. NLS se tak stává modelovým nástrojem jejich diagnostiky, léčby a zásadním způsobem může pomoci naplňovat Doporučení Rady Evropské unie o akci v oblasti RD z roku 2009 (Rada Evropské unie, 2009) a Usnesení Vlády ČR z roku 2010 o Národní strategii pro RD na léta 2010–2020 (Vláda ČR, 2010). Tyto národní a nadnárodní strategické dokumenty mají za cíl zlepšit identifikaci pacientů s RD, podporovat rozvoj zdravotní politiky a rozvíjet evropskou spolupráci. Vznik této iniciativy je logický, neboť relativně velký počet všech pacientů s RD v Evropě vyžaduje koordinovanou spolupráci a řešení.

Přehled nejčastějších RD dětského věku je široký, zahrnuje různá systémová onemocnění od cystické fibrózy počínaje, přes neurodegenerativní, hematologické, nádorové, revmatologické či endokrinní nemoci, metabolické poruchy, primární poruchy imunity až po extrémně vzácné genodermatózy (Tab. 2, Kubáčková K., 2014).

Tab. 2 Přehled nejčastějších vzácných onemocnění dětského věku

Skupina nemocí	Příklady
Pneumologická onemocnění	Cystická fibróza
Genodermatózy	Epidermolysis bullosa congenita, neurofibromatóza, Ehler-Danlosův syndrom
Neurodegenerativní onemocnění	Spinální muskulární atrofie, leukodystrofie, heredoataxie, amyotrofická laterální skleróza, Wilsonova nemoc
Hematologická onemocnění	Leukémie, lymfomy, histiocytóza, myelodysplastický syndrom, Fanconiho anémie, vrozené koagulopatie
Nádorová onemocnění	Mozkové nádory, hepatocelulární karcinom, maligní melanom
Endokrinní onemocnění	Kongenitální hypotyreóza, kongenitální adrenální hyperplázie, deficit růstového hormonu, Addisonova nemoc
Primární imunodeficience	Těžký kombinovaný imunodeficit, Brutonova agamaglobulinémie, Kostmanův syndrom, DiGeorgeův syndrom
Dědičné poruchy metabolismu	Fenylketonurie, poruchy beta oxidace, lysosomální onemocnění, leucinóza, organické acidurie, poruchy karnitinových přenašečů, argininémie, citrulinémie, deficit biotinidázy, homocystinurie, Fabryho nemoc
Revmatická onemocnění	Juvenilní idiopatická artritida, systémová onemocnění pojiva, primární vaskulitidy, autoinflamatorní nemoci
Kardiologická onemocnění	Kardiomyopatie, plicní arteriální hypertenze
Nefrologická onemocnění	Alportův syndrom, kongenitální nefrotický syndrom, tubulopatie
Onemocnění v orofaciální oblasti	Crouzonův syndrom, Pierre-Robinova sekvence, dentinogenesis imperfecta

Zdroj: Kubáčková K., 2014

1.3 Provedení novorozeneckého laboratorního screeningu v České republice

Odběr krve z paty se provádí celoplošně všem novorozencům, jejichž rodiče, resp. zákonní zástupci, vysloví souhlas. Konkrétní formu informovaného souhlasu (nepsanou či psanou, s/bez podpisu) si stanovuje daný poskytovatel zdravotních služeb dle svých vnitřních předpisů. Odběr se provádí standardizovaným způsobem mezi 48. a 72. hodinou života novorozence (Metodický návod k zajištění novorozeneckého laboratorního screeningu a následná péče, MZ ČR, 2016), tedy nejčastěji v porodnici. Při časně dimisi z porodnice či při domácím porodu je za odběr zodpovědný registrující praktický lékař pro děti a dorost. Na samopropisovací screeningové kartičky se odebírá kapilární krev z nahřáté paty novorozence. Samotný odběr se provádí incizí (nikoli vpichem) sterilní lancetou z laterální strany paty novorozence. Tyto tzv. suché krevní kapky se do 24 h po odběru a zaschnutí odesílají běžnou poštou do centrálních screeningových laboratoří, které se nachází v Praze, Brně a Olomouci. Došlé vzorky se obvykle vyšetřují v den dodání materiálu, resp. nejpozději následující pracovní den.

Správná technika odběru v preanalytické fázi je základním předpokladem pro optimální stanovení koncentrace analytů v suché krevní kapce. Speciální filtrační papír, ze kterého je screeningová kartička vyhotovena, je charakterizován přesně danými parametry (např. nasákavostí). Z toho vyplývá fakt, že opakované nasáknutí kartičky krví nebo její sušení horkem může zásadně zkreslit výsledky vyšetření (Pešková K., Chrastina P. et al., 2018).

V případě zjištění koncentrace analytu pod „cutoff“ hodnotou je výsledek považován za negativní. „Cutoff“ hodnota je obecně přijatá hranice mezi negativitou a pozitivitou. Negativní výsledek z NLS se aktivně rodičům, resp. zákonným zástupcům, z organizačních důvodů nesděljuje. Tento fakt je dán principem celého novorozeneckého screeningového programu, který je odlišný od ostatních běžných laboratoří. V NLS je zodpovědnost postavena na screeningové laboratoři nejen za analýzu, ale i za příslušný, přesně definovaný,

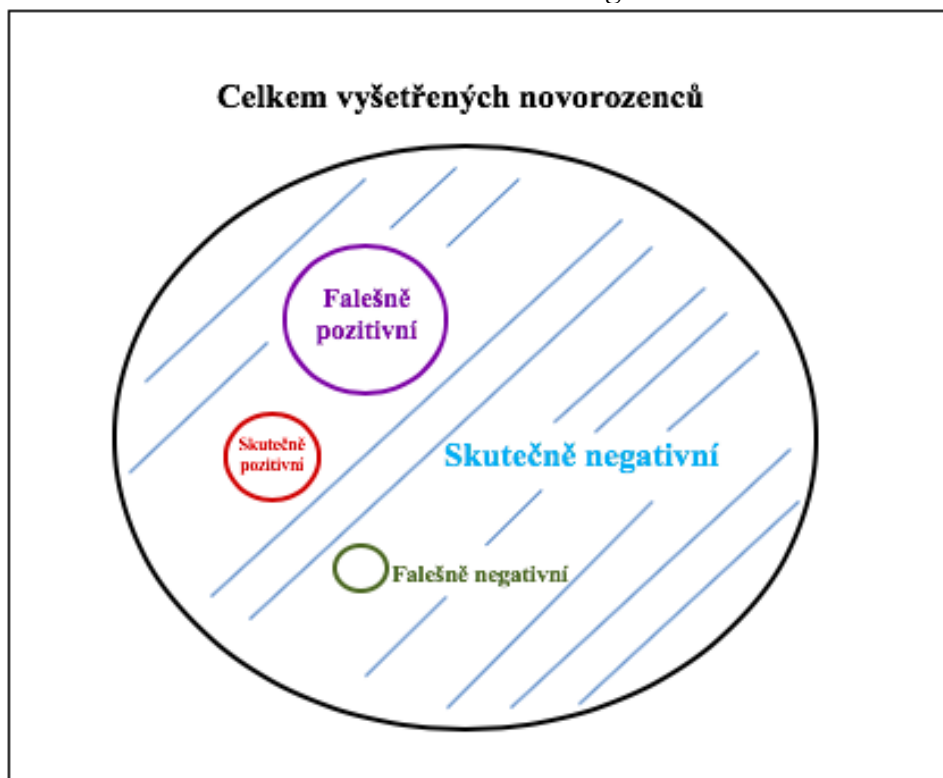
postup v případě výsledků nad „cutoff“ hodnotou a zajištění další péče o zachycené pacienty. Na ošetřujícím lékaři, resp. poskytovateli zdravotních služeb, v jehož péči je daný novorozenec, je pouze odběr suché krevní kapky a v indikovaných případech tzv. rescreening (viz dále) nebo opakování odběru na výzvu screeningové laboratoře.

Při pozitivní nebo nejasné hodnotě analytu je novorozenec dále vyšetřován, a to buď opakováním odběru suché krevní kapky na screeningovou kartičku na výzvu screeningové laboratoře („*Recall*“) nebo je přímo předán ke konfirmační diagnostice, léčbě a dalšímu sledování příslušnému klinickému pracovišti. Odběr materiálu se může opakovat též z důvodu tzv. rescreeningu, tedy plánovaného a závazného druhého odběru kapilární krve na screeningovou kartičku, který indikuje ošetřující lékař vyšetřovaného novorozence na základě klinické situace daného pacienta. Indikační kritéria rescreeningu upravuje Metodický návod ve Věstníku MZ ČR 6/2016 (Metodický návod k zajištění novorozeneckého laboratorního screeningu a následná péče, MZ ČR, 2016) a konkrétní příklady budou uvedeny dále v textu u jednotlivých screenovaných nemocí (kapitola 1.4).

Pojmem pozitivní screeningový nález se rozumí, že jedinec má pouze zvýšené riziko dané nemoci. Screening je nástroj vyhledávací, nikoliv diagnosticky konfirmační. Proto v případě pozitivního nálezu je nezbytné provést návazná diagnostická testování, která onemocnění potvrdí nebo vyloučí. Screeningové programy lze hodnotit pomocí senzitivity, specificity a pozitivní prediktivní hodnoty (PPV). Senzitivitu screeningového testu definujeme jako poměr počtu zachycených nemocných k celkovému počtu nemocných, tj. s připočtením testem nezachycených jedinců (tzv. falešně negativních nálezů, FN). Na druhé straně, specificita představuje poměr počtu jedinců hodnocených screeningovým testem jako negativní k celkovému počtu zdravých jedinců, tj. s připočtením testem zachycených, tzv. falešně pozitivních (FP) jedinců. Mezi oběma parametry platí nepřímá úměra, tj. čím vyšší je senzitivita, tím nižší je specificita a naopak. Posledním parametrem, závislým na obou předchozích a prevalenci nemoci v populaci, je PPV. Ta vyjadřuje poměr počtu nemocných zachycených screeningovým testem k celkovému počtu jedinců hodnocených testem jako

pozitivní, tj. s připočtením FP nálezů. PPV je jinými slovy pravděpodobnost, že je osoba nemocná při pozitivním výsledku screeningového testu (Zvárová J., 2011). Na obrázku 1 jsou znázorněny vztahy jednotlivých výše uvedených pojmů.

Obr. 1 Vztahy jednotlivých pojmů, které charakterizují novorozenecký laboratorní screening



Zdroj: vlastní

Hlavními riziky NLS jsou právě FP a FN nálezy. FP nálezy přináší stigmatizaci zdravé části populace a přináší vyšší nákladovost celého screeningového programu. Dalším problémem NLS je možnost detekce mírných forem screenovaných nemocí s rizikem zahájení léčby u dítěte, které ji ve své podstatě nepotřebuje („*Overtreatment*“). Nabízí se otázka, jak k těmto pacientům s mírnou formou nemoci přistupovat. Většinou totiž nemají žádné klinické obtíže, jedná se jen o laboratorní nález vyžadující další sledování („*Follow-up*“), který stigmatizuje svého nositele a představuje tak etický problém. Konkrétní příklady budou zmíněny u jednotlivých nemocí dále (kapitoly 1.4.2, 1.4.4, 4.4).

1.4 Nemoci vyhledávané v České republice

V ČR probíhá NLS celoplošně od roku 1975 a počet screenovaných nemocí se v průběhu let postupně zvyšoval. Rozšířen byl několikrát, a to v letech 1985, 2006, 2009 a naposledy v roce 2016. V roce 2018 zahrnuje NLS v ČR osmnáct nemocí jak ze spektra dědičných metabolických poruch či jiných geneticky podmíněných nemocí, tak i dvě endokrinní onemocnění (Tab. 3). Oficiálním orgánem, který zajišťuje provádění NLS z pověření MZ ČR, je Koordinační centrum pro novorozenecký screening se sídlem ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze a které bylo zřízeno v roce 2010 (Metodický návod k zajištění novorozeneckého laboratorního screeningu a následná péče, MZ ČR, 2016). Tato instituce zajišťuje informovanost odborné i laické veřejnosti, nastavuje pravidla organizace screeningu, je partnerem pro MZ ČR a zdravotní pojišťovny pro koordinaci následné péče o zachycené pacienty a financování NLS, též celý systém průběžně vyhodnocuje.

Tab. 3 Nemoci vyhledávané novorozeneckým laboratorním screeninem v České republice v roce 2018

Fenylketonurie/hyperfenylalaninémie
Kongenitální hypotyreóza
Deficit 21-hydroxylázy
Cystická fibróza
Deficit dehydrogenáz acyl-CoA se středně dlouhým řetězcem
Deficit dehydrogenáz 3-hydroxyacyl-CoA s dlouhým řetězcem
Deficit dehydrogenáz acyl-CoA s velmi dlouhým řetězcem
Deficit karnitinpalmitoyltransferázy I
Deficit karnitinpalmitoyltransferázy II
Deficit karnitinacylkarnitintranslokázy
Glutarová acidurie, typ I
Leucinóza
Izovalerová acidurie
Citrulinémie
Deficit biotinidázy
Homocystinurie při deficitu cystationin beta-syntázy
Homocystinurie při deficitu metylentetrahydrofolát reduktázy
Argininémie

Zdroj: Metodický návod k zajištění novorozeneckého laboratorního screeningu a následná péče, Ministerstvo zdravotnictví České republiky, 2016

1.4.1 Dědičné poruchy metabolismu

NLS dědičných poruch metabolismu byl v ČR poprvé celoplošně zahájen pro fenylketonurii/hyperfenylalaninémii (PKU/HPA), a to v roce 1975 (Blelová B., Pažoutová M. et al., 1976). V říjnu 2009 byl pak rozšířen o dalších devět dědičných poruch metabolismu: poruchy beta oxidace, jmenovitě deficit dehydrogenáz acyl-CoA se středně dlouhým, 3-hydroxyacyl-CoA s dlouhým a acyl-CoA s velmi dlouhým řetězcem (MCADD, LCHADD a VLCADD), dále o leucinózu neboli nemoc javorového sirupu (MSUD), glutarovou acidurii typu I (GA I), izovalerovou acidurii (IVA) a poruchy karnitinových přenašečů, tedy o deficit karnitinpalmitoyltransferázy I a II (CPTD I a II) a deficit karnitinacylkarnitintranslokázy (CACTD). Od července 2016 došlo k poslednímu rozšíření o vyhledávání pacientů s argininémií (ARG), citrulinémií (CIT), deficitem biotinidázy (BTD) a dvěma typy homocystinurie, tj. při deficitu cystathionin beta-syntázy (CBSD HCU) a při deficitu metyilentetrahydrofolát reduktázy (MTHFRD HCU).

Všechny uvedené metabolické poruchy jsou autozomálně recesivně dědičné. Společnou patofyziologickou podstatou je enzymatický blok či změny ve složení a množství strukturálních či transportních proteinů (Pešková K., Chrastina P. et al., 2018). Klinické projevy jsou variabilní, mohou postihovat jakýkoli systém. První příznaky se již obvykle objevují v novorozeneckém věku nebo během raného dětství. Včasná diagnóza je důležitá jak pro rychlé zahájení léčby, tak pro potřebu genetického poradenství a prenatální diagnostiky v rodině (Kolářová H., Honzík T., 2018).

K detekci koncentrace aminokyselin a acylkarnitinů využívá NLS téměř u všech screenovaných poruch metabolismu metodu tandemové hmotnostní spektrometrie („*Tandem Mass Spectrometry*“, MS/MS). Pouze pacienti s BTD jsou vyhledáváni fluorimetrickou metodou. „Cutoff“ hodnoty se liší pro jednotlivé analyty dle norem dané screeningové laboratoře v závislosti na užití derivatizujících (Praha) či nederivatizujících (Olomouc) esejí (Tab. 4). Pozitivní nálezy se potvrzují na úrovni enzymu či genu v několika specializovaných

laboratořích v ČR nebo v zahraničí (Tab. 5). Podání parenterální výživy (aminokyselin, glukózy či lipidů) novorozenci 48 hodin před odběrem suché krevní kapky je důvodem tzv. rescreeningu. Jedná se o opakovaný odběr suché krevní kapky na screeningovou kartičku s odstupem cca jednoho až dvou týdnů k vyloučení FN nálezu (Metodický návod k zajištění novorozeneckého laboratorního screeningu a následná péče, MZ ČR, 2016).

Následnou péči pro pacienty s prokázanou dědičnou metabolickou poruchou zajišťují specializovaná pracoviště. Léčitelné jsou však jen některé nemoci, většinou se uplatňuje nutriční terapie (Floriánková M., Bláhová Š. et al., 2018).

Typickým a nejdéle vyhledávaným zástupcem dědičných metabolických poruch je PKU/HPA. Jedná se o autozomálně recesivně dědičné onemocnění s porušenou tvorbou enzymu fenylalaninhydroxylázy v játrech. Tento enzym se účastní přeměny aminokyseliny fenylalaninu (Phe) na tyrozin za přítomnosti kofaktoru tetrahydrobiopterinu (BH4). Porucha vzniká změnou genetické informace pro enzym fenylalaninhydroxylázu na dvanáctém chromozomu (Blau N., Van Spronsen FJ. et al., 2010). Množství kumulujícího se Phe v organismu odpovídá tomu, jak závažné je poškození funkce enzymu. Prediktorem je genotyp pacienta. Doba, po kterou je organismus vystaven vyšší hladině Phe a její kolísání, se projeví na míře poškození tkání, zvláště centrálního nervového systému (Van Spronsen FJ., Van Wegberg AM. et al., 2017). Časný záchyt v NLS umožní zahájit léčbu, která spočívá v přísné nízkobílkovinné dietě s přesně definovaným množstvím obsahu Phe a kalorií. Cena zachycení jednoho pacienta s PKU/HPA v systému NLS v ČR se odhaduje na cca 100 000 Kč. Kauzální terapie dosud není známá. Někteří pacienti s definovaným genotypem mohou profitovat z léčby sapropterinem, což je syntetická forma kofaktoru BH4 (Keil S., Anjema K. et al., 2013).

Tab. 4 „Cutoff“ hodnoty pro jednotlivé dědičné metabolické poruchy, kde vzhledem k odlišné metodice závislé na screeningové laboratoři hodnoty v závorkách představují „cutoff“ hodnoty pro nederivatizující eseje

Nemoc	Analyt	„Cutoff“ v kapilární krvi
Fenylketonurie/hyperfenylalaninémie	Fenylalanin (Phe) Tyrosin (Tyr)	Phe > 120 µmol/l a Phe/Tyr ratio > 2,00
Deficit dehydrogenáz acyl-CoA se středně dlouhým řetězcem	Octanoylkarnitin (C8) Acetylkarnitin (C2)	C8 > 0,40 (0,50) µmol/l a C8/C2 > 0,02 (0,03) µmol/l
Deficit dehydrogenáz 3-hydroxyacyl-CoA s dlouhým řetězcem	Hydroxypalmitoylkarnitin (C16OH) Hydroxyoleoylkarnitin (C18:1OH)	C16OH > 0,10 µmol/l nebo C18:1OH > 0,10 (0,07) µmol/l
Deficit dehydrogenáz acyl-CoA s velmi dlouhým řetězcem	Tetradecenoylkarnitin (C14:1) Acetylkarnitin (C2) Palmitoylkarnitin (C16)	C14:1 > 0,55 (0,40) µmol/l a C14:1/C2 > 0,03 a C14:1/C16 > 0,26 (0,15)
Deficit karnitinpalmitoyltransferázy I	Volný karnitin (C0) Palmitoylkarnitin (C16) Oleoylkarnitin (C18:1) Acetylkarnitin (C2)	C0 > 60,3 (57,0) µmol/l a C0/(C16+C18) > 25,0 (29,0) a (C16+C18:1)/C2 < 0,10
Deficit karnitinpalmitoyltransferázy II Deficit karnitinacylkarnitintranslokázy	Palmitoylkarnitin (C16) Oleoylkarnitin (C18:1) Acetylkarnitin (C2)	C16 > 5,06 (7,00) µmol/l a (C16+C18:1)/C2 > 0,35 (0,48)
Glutarová acidurie, typ I	Glutarylkarnitin (G5DC) Octanoylkarnitin (C8) Palmitoylkarnitin (C16)	C5DC > 0,40 (0,60) µmol/l a C5DC/C8 > 5,40 (C5DC/C16 > 0,40)
Leucinóza	Leucin (Leu) Isoleucin (Isoleu) Hydroxyprolin (Hyp) Alanin (Ala) Valin (Val) Tyrosin (Tyr) Fenylalanin (Phe)	Leu + Isoleu + Hyp > 270 µmol/l (Leu > 260 µmol/l) a Leu/Ala > 1,40 (1,25) nebo Leu + Val/Phe + Tyr > 3,79
Izovalerová acidurie	Isovalerylmethylbutyrylkarnitin (C5) Volný karnitin (C0) Propionylkarnitin (C3) Octanoylkarnitin (C8)	C5 > 1,00 (0,60) µmol/l a C5/C0 > 0,03 a C5/C3 > 0,39 (C5/C8 > 20,0)
Citrulinémie	Citrullin (Cit) Ornithin (Orn) Fenylalanin (Phe)	Cit > 70,0 (56,0) µmol/l a Orn/Cit < 2,09 (2,51) a Cit/Phe > 0,95 (0,81)
Deficit biotinidázy	Sérová aktivita biotinidázy	Sérová aktivita biotinidázy < 30,0 % než medián střední populace
Homocystinurie při deficitu cystationin beta-syntázy	Metionin (Met) Fenylalanin (Phe) Homocystein (Hcys)	Met > 33,0 (36,4) µmol/l a Met/Phe > 0,58 (0,41) a Hcys > 12,0 (15,0) µmol/l
Homocystinurie při deficitu metylentetrahydrofolát reduktázy	Metionin (Met) Fenylalanin (Phe) Homocystein (Hcys)	Met < 7,00 µmol/l nebo Met/Phe < 0,15 (0,10) a Hcys > 12,00 (15,0) µmol/l
Argininémie	Arginin (Arg) Ornithin (Orn) Fenylalanin (Phe)	Arg > 60,0 (63,0) µmol/l a Arg/Orn > 0,75 (0,40) a Arg/Phe > 1,02 (0,98)

Zdroj: Laboratoře novorozeneckého screeningu v Praze a Olomouci

Tab. 5 Konfirmační kritéria screenovaných poruch metabolismu

Nemoc	Definiční kritéria (venózní krev)
Fenylketonurie/ Hyperfenylalaninémie	Fenylalanin > 120 µmol/l
Deficit dehydrogenáz acyl-CoA se středně dlouhým řetězcem	Octanoylkarnitin a acetylkarnitin nad referenční mez a prokázaný deficit dehydrogenáz acyl-CoA se středně dlouhým řetězcem nebo dvě patogenní mutace v <i>ACADM</i> genu nebo snížená oxidace mastných kyselin v lymfocytech
Deficit dehydrogenáz 3-hydroxyacyl-CoA s dlouhým řetězcem	Hydroxypalmitoylkarnitin a hydroxyoleoylkarnitin nad referenční mez a deficit dehydrogenáz 3-hydroxyacyl-CoA s dlouhým řetězcem nebo dvě patogenní mutace v genu <i>HADHA</i> nebo snížená oxidace mastných kyselin v lymfocytech
Deficit dehydrogenáz acyl-CoA s velmi dlouhým řetězcem	Tetradecenoylkarnitin, acetylkarnitin a palmitoylkarnitin nad referenční mez a prokázaný deficit dehydrogenáz acyl-CoA s velmi dlouhým řetězcem nebo dvě patogenní mutace v genu <i>ACADVL</i> nebo snížená oxidace mastných kyselin v lymfocytech
Deficit karnitinpalmitoyltransferázy I	Volný karnitin, palmitoylkarnitin, oleoylkarnitin a acetylkarnitin nad referenční mez a prokázaný deficit karnitinpalmitoyltransferázy I nebo dvě patogenní mutace v genu <i>CPT1A</i> nebo snížená oxidace mastných kyselin v lymfocytech
Deficit karnitinpalmitoyltransferázy II	Palmitoylkarnitin, oleoylkarnitin a acetylkarnitin nad referenční mez a prokázaný deficit karnitinpalmitoyltransferázy II nebo dvě patogenní mutace v <i>CPT2</i> genu
Deficit karnitinacylkarnitin-translokázy	Palmitoylkarnitin, oleoylkarnitin a acetylkarnitin nad referenční mez a prokázaný deficit karnitinacylkarnitin-translokázy nebo dvě patogenní mutace v <i>SLC25A20</i> genu
Glutarová acidurie, typ I	Glutarylkarnitin, octanoylkarnitin a palmitoylkarnitin nad referenční mez a deficit glutaryl CoA dehydrogenázy nebo dvě patogenní mutace v <i>GCD</i> genu
Leucinóza	Leucin, isoleucin, hydroxyprolin, alanin, valin, tyrosin a fenylalanin nad referenční mez a deficit branchedchain ketoacid dehydrogenázy nebo dvě patogenní mutace v genech <i>BCKDHA</i> nebo <i>BCKDHB</i> nebo <i>DBT</i>
Izovalerová acidurie	Isovaleryl/methybutyrylkarnitin, volný karnitin, propionylkarnitin a octanoylkarnitin nad referenční mez a deficit isovaleryl CoA dehydrogenázy nebo dvě patogenní mutace v <i>IVD</i> genu
Citrulinémie	Deficit argininsukcinát syntázy nebo dvě patogenní mutace v <i>ASS1</i> genu
Deficit biotinidázy	Deficit biotinidázy nebo dvě patogenní mutace v <i>BTD</i> genu
Homocystinurie při deficitu cystationin beta-syntázy	Deficit cystationin beta-syntázy nebo dvě patogenní mutace v <i>CBS</i> genu
Homocystinurie při deficitu metylentetrahydrofolát reduktázy	Deficit metylentetrahydrofolát reduktázy nebo dvě patogenní mutace v <i>MTHFR</i> genu
Argininémie	Deficit arginázy nebo dvě patogenní mutace v <i>ARG1</i> genu

Zdroj: Laboratoře novorozeneckého screeningu v Praze a Olomouci

1.4.2 Kongenitální hypotyreóza

Kongenitální hypotyreóza („*Congenital Hypothyroidism*“, CH) je nejčastější vrozené endokrinní onemocnění, jehož projevy vznikají v důsledku nedostatku tyreoidálních hormonů jak v prenatálním, tak i v postnatálním období. Zahrnuje permanentní i tranzientní vrozenou poruchu tvorby hormonů štítné žlázy, nejčastěji na podkladě dysgeneze (až v 85 %), vzácněji na podkladě dyshormonogeneze. U CH je častěji popisován výskyt vrozených srdečních vad a Downova syndromu (Lebl J., Taji E. et al., 2016).

NLS pro CH byl v ČR zahájen v roce 1985 (Hníková O., Kračmar P. et al., 1989). Cílem bylo zabránění ireverzibilnímu poškození mozku, neboť tyreoidální hormony jsou klíčové pro vývoj centrální nervové soustavy, zejména v prvních osmi měsících života (tzv. kritické období). Při neléčené CH se opoždí i růst a vývoj, naopak při časném zahájení substituční léčby se jedinec vyvíjí normálně a jeho celoživotní prognóza je velmi příznivá. Cena detekce jednoho pacienta s CH systémem NLS je cca 280 000 Kč.

Analytickým markerem je v současné době tyreostimulační hormon (TSH). „Cutoff“ hodnota $TSH \geq 15,0$ mIU/l je považována za pozitivní a vyžaduje potvrzení. Nezralost (resp. porodní hmotnost $< 1\,500$ g), podání dopaminu, kortikoidů, jódové kontrastní látky či léků s vysokým obsahem jódu novorozenci 48 hodin před odběrem suché krevní kapky je důvodem tzv. rescreeningu k vyloučení FN nálezů (Metodický návod k zajištění novorozeneckého laboratorního screeningu a následná péče, MZ ČR, 2016). Stejná situace nastává, pokud i matka v posledním trimestru gravidity užívala tyreostatika či léky s vysokým obsahem jódu, event. jí byla podána jódová kontrastní látka. NLS CH detekuje též mírné, většinou tranzientní formy, které tvoří až 28 % ze všech detekovaných pacientů (Korzeniewski S., Grigorescu V. et al., 2013). Z tohoto důvodu se doporučuje reevaluace tyreoidálních hormonů po třetím roce života, právě k vyloučení těchto přechodných forem (Léger J., Olivieri A. et al., 2014).

Definitivní diagnózu CH určí koncentrace $TSH > 8$ mIU/l nebo hodnota volného tyroxinu (fT4) < 12 pmol/l ze žilního odběru krve. Ultrasonografické

vyšetření upřesní velikost a strukturu štítné žlázy. Léčba je substituční, podává se levothyroxin v denní dávce 10–15 µg/kg (Lebl J., Taji E. et al., 2016).

1.4.3 Deficit 21-hydroxylázy

Deficit 21-hydroxylázy je v cca 95 % nejčastěji se vyskytující forma kongenitální adrenální hyperplázie („*Congenital Adrenal Hyperplasia*“, CAH). CAH představuje skupinu nemocí s vrozenou poruchou syntézy steroidních hormonů s autozomálně recesivním přenosem. Deficit 21-hydroxylázy je způsoben mutací v genu *CYP21A2*. Enzym 21-hydroxyláza se účastní biosyntézy kortizolu a aldosteronu, konvertuje 17-hydroxyprogesteron (17OHP) na 11-deoxykortizol a progesteron na 11-deoxykortikosteron. Klinické projevy a závažnost deficitu 21-hydroxylázy závisí na zbytkové aktivitě chybějícího enzymu (Tab. 6, Kliegman R., 2011) a tím nejvíce na typu mutace v *CYP21A2* genu (Speiser P., Azziz R. et al., 2010).

Tab. 6 Vztah fenotypu a aktivity 21-hydroxylázy

Forma	Fenotyp	Aktivita 21-hydroxylázy	Deficit kortizolu	Deficit aldosteronu	Nadbytek androgenů
Klasická	Solná porucha	0–1 %	++	++	++
	Přechodná forma	1–5 %	++	+ -	++
	Prostá virilizující	5–10 %	+	+ -	++
Neklasická	Pozdně nastupující	10–50 %	+ -	-	+

Zdroj: Kliegman R., 2011

Pravidelný celoplošný NLS deficitu 21-hydroxylázy byl v ČR zahájen 7. února 2006 v Praze a 1. listopadu 2006 v Brně. Jeho cílem je včasným záchytem a včasnou léčbou zabránit rozvoji život ohrožující solné krize u nejtěžších forem onemocnění a vzniku předčasné pseudopuberty s výsledným malým vzrůstem u lehčích forem. Cena stanovení jednoho pacienta s touto nemocí je cca 1,4 milionu Kč. NLS detekuje deficit 21-hydroxylázy pomocí zvýšených hladin 17OHP v suché krevní kapce odebrané novorozencům mezi 48. až 72. hodinou života. „Cutoff“ hodnoty jsou stanoveny dle porodní hmotnosti.

Léčba spočívá v substitučním podávání kortikoidů, event. mineralkortikoidů a solných kapslí. Podrobněji o klinických projevech, diagnostickém postupu a léčbě deficitu 21-hydroxylázy pojednává kapitola 4.4.

1.4.4 Cystická fibróza

Cystická fibróza („*Cystic Fibrosis*“, CF) je nejčastější autozomálně recesivní onemocnění v evropské populaci, projevující se zejména chronickým progresivním plicním postižením a pankreatickou insuficiencí. Patofyziologickým podkladem je defekt ve funkci CFTR („*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*“) proteinu, který reguluje viskozitu hlenu (tzv. chloridový kanál). Nejčastější patogenní mutací genu *CFTR* je F508del (Lebl J., 2012).

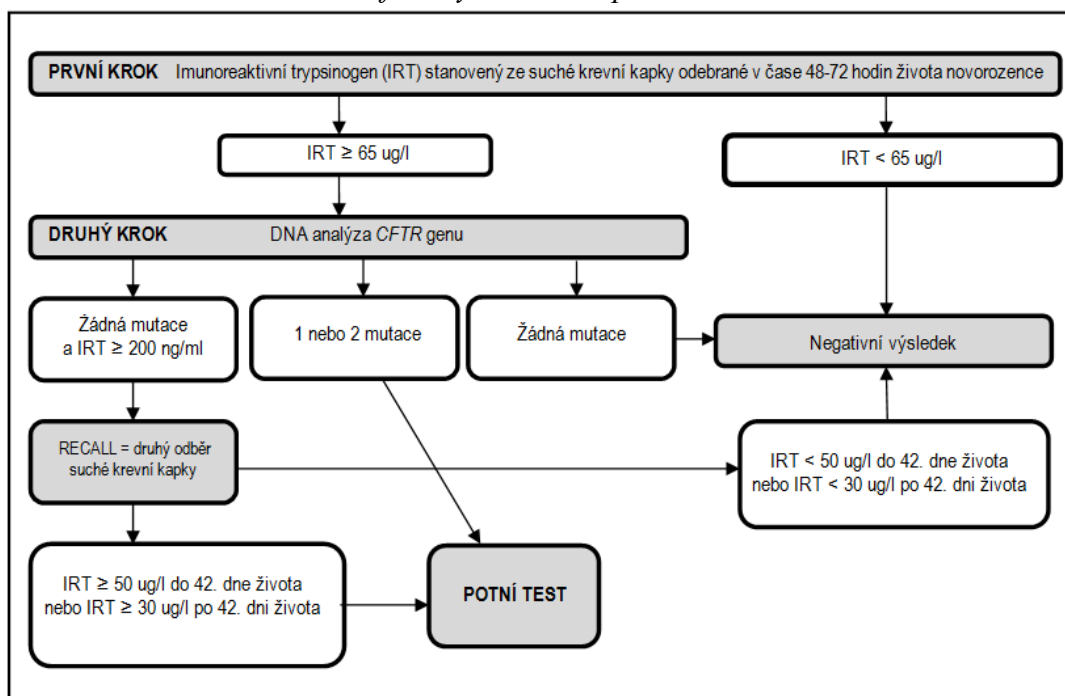
NLS CF byl v ČR zahájen v roce 2009 (Sommerburg O., Krulišová V. et al., 2014) a představuje významný nástroj pro časnou diagnostiku a léčbu pacientů s CF (Barben J., Castellani C. et al., 2017). Cena zachycení jednoho pacienta se odhaduje na cca 900 000 Kč. NLS CF spočívá ve dvou krocích. První je založen na imunoanalytickém stanovení imunoreaktivního trypsinogenu (IRT) v suché krevní kapce odebrané mezi 48. a 72. hodinou života novorozence. Následně ze vzorků s nejvyšším IRT (≥ 99 . percentil, tj. „cutoff“ 65 $\mu\text{g/l}$) je provedena DNA (deoxyribonukleová kyselina) analýza *CFTR* genu, která v současné době pokrývá 50 patogenních mutací (cca 91 % všech patogenních mutací vyskytujících se v ČR). Jedinci s nejvyšším IRT (≥ 200 ng/ml) a zároveň bez průkazu patogenních mutací *CFTR* genu jsou podstoupeni kontrolnímu IRT odběru, tzv. IRT *Recall* (Castellani C., Duff A. et al., 2018). Výsledky DNA analýzy se rodičům, resp. zákonným zástupcům, screenovaných dětí nesdělují.

Novorozenci s nálezem alespoň jedné patogenní mutace či vysokým IRT jsou vyšetřeni potním testem, který je založen na pilokarpinové metodě (Kharrazi M., Milla C. et al., 2016). Za normu je považována koncentrace chloridů v potu do 30 mmol/l. Diagnóza CF je stanovena na základě výsledku potního testu: hodnoty 60 mmol/l a více nebo 30–59 mmol/l a současný průkaz dvou patogenních *CFTR* mutací. Na obrázku 2 je znázorněn diagnostický protokol NLS

CF v ČR, „cutoff“ hodnoty, indikace k DNA analýze a provedení potního testu (Castellani C., Duff A. et al., 2018).

NLS CF též detekuje mírné či nejasné formy onemocnění, které se označují jako tzv. „*CF Screen Positive, Inconclusive Diagnosis*“ (CFSPID). Jedná se o novorozence s výsledkem potního testu v „šedé zóně“, tj. 30–59 mmol/l s žádnou nebo jednou patogenní mutací *CFTR* genu nebo s negativním výsledkem potního testu, tj. < 30 mmol/l a dvěma prokázanými mutacemi *CFTR* genu s nejasným klinickým významem (např. R117H, D1152H). Tito zachycení jedinci léčeni nejsou, vyžadují jen sledování, jen někteří z nich jsou v průběhu reklasifikováni na CF.

Obr. 2 Schéma diagnostického protokolu novorozeneckého screeningu cystické fibrózy v České republice



Zdroj: upraveno dle Castellani C., Duff A. et al., 2018

Standardní léčba CF by měla probíhat ve specializovaném centru a sestává ze třech pilířů: lékařské péče včetně farmakoterapie, rehabilitace a nutriční terapie. Specifická léčba existuje jen u několika patogenetických tříd CF a spočívá v podávání tzv. CFTR modulátorů, které ovlivňují funkci proteinu CFTR (*Ivacaftor*, *Lumacaftor*, Bulloch M., Hanna C. et al., 2017).

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem dizertační práce je vyhodnotit jak klinickou, tak především celopopulační efektivitu celostátního celoplošného NLS a optimalizovat bilanci mezi jeho detekční schopností a zátěží zdravé části populace.

Jednotlivé dílčí cíle jsou následující:

1. vyhodnotit efektivitu detekce a prevalenci jednotlivých screenovaných nemocí,
2. stanovit prevalenci screenovaných nemocí u novorozenců s nízkou porodní hmotností (NPH),
3. vyhodnotit FP v NLS deficitu 21-hydroxylázy,
4. vypracovat diagnostický postup u novorozenců zachycených v NLS deficitu 21-hydroxylázy v ČR.

Ad 1. Zahraniční systémy NLS jsou efektivní a vykazují vysokou detekční schopnost (Loeber G., Burgard P. et al., 2012). Proces vyhodnocení efektivity je velmi důležitý ke zlepšení celého procesu. Cílem je vyhodnotit prevalenci screenovaných nemocí v ČR v letech 2010–2017, jejich FP, PPV a tím i efektivitu celého screeningového programu. Vzhledem k tomu, že všechny vyhledávané nemoci zařazené do NLS v ČR patří mezi RD, výstupem je též vyhodnocení prevalence některých RD v ČR (kapitola 4.1).

Ad 2. Během posledních desetiletí narůstá procentuální zastoupení novorozenců s NPH, definovanou hmotností pod 2 500 g (ÚZIS ČR, 2017). Nabízí se otázka, zda je NPH spojena s vyšším rizikem výskytu screenovaných nemocí. Některé studie již potvrdily asociaci mezi NPH a CH (Dalili S., Rezvany S. et al., 2012) a CF (Festini F., Taccetti G. et al., 2005). Cílem je ověřit, zda je ve skupině novorozenců s NPH signifikantně vyšší prevalence všech nebo jen některých nemocí vyhledávaných pomocí systému NLS v ČR v letech 2002–2016 (kapitola 4.2).

Ad 3. NLS deficitu 21-hydroxylázy spočívá ve stanovení koncentrace 17OHP v suché krevní kapce odebrané novorozencům. 17OHP je stanoven imunofluorescenční metodou, která je zatížena relativně vysokou FP (Minutti C., Lacey J. et al., 2004). V současnosti se užívají „cutoff“ hodnoty pro 17OHP vztažené k porodní hmotnosti novorozence. Cílem je ověřit, zda hodnocení 17OHP dle gestačního věku (Torresani T., Gruters A. et al., 1994) sníží FP (kapitola 4.3).

Ad 4. NLS deficitu 21-hydroxylázy vykazuje v ČR i v jiných zahraničních programech vysokou efektivitu (Steigert M., Schoenle E. et al., 2002). Interpretace 17OHP je však komplikovaná, je závislá na postnatálním věku při odběru, gestačním věku, porodní hmotnosti novorozence a jeho aktuální klinické situaci (Anandi S. et Shaila B., 2017). Cílem je vypracovat diagnostický postup u pacienta zachyceného v NLS deficitu 21-hydroxylázy v ČR (kapitola 4.4).

3. METODIKA

Dizertační práce je založena na monotematicky zaměřeném souboru čtyř vědeckých publikací. K zpracování a analýze byla využita data z centrálních screeningových laboratoří v Praze, Brně a Olomouci (Tab. 7, www.novorozeneckyscreening.cz). Do souboru byli zahrnuti novorozenci vyšetřeni v letech 2002–2017. Screeningové kartičky se suchými krevními kapkami byly analyzovány metodou imunoanalytickou, spektrometrickou (MS/MS) a fluorimetrickou.

Tab. 7 Přehled centrálních screeningových laboratoří v České republice

Imunoanalytické metody	Tandemová hmotnostní spektrometrie, fluorimetrie	Molekulárně genetická diagnostika <i>CFTR</i> genu
Klinika dětí a dorostu, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady	Klinika dětského a dorostového lékařství, Všeobecná fakultní nemocnice	Ústav biologie a lékařské genetiky, Fakultní nemocnice v Motole
Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Brno	Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc	Oddělení lékařské genetiky, Fakultní nemocnice Brno

Zdroj: www.novorozeneckyscreening.cz

Imunoanalýza s přístroji Delfia® a AutoDelfia® (firmy Perkin-Elmer, Waltham, Spojené státy americké) byla využita k detekci TSH v NLS CH (Buyukgebiz A., 2006) a 17OHP v NLS deficitu 21-hydroxylázy (Votava F., Novotná D. et al., 2012). Princip spočíval v imunoenzymatické reakci mezi antigenem a protilátkou. Výše zmíněná metoda byla využita i při detekci IRT v NLS CF (Sommeburg O., Krulišová V. et al., 2014). Ve skupině novorozenců s nejvyšším IRT následoval druhý analytický krok, tj. DNA analýza *CFTR* genu (eseje Elucigene CFEU1™, Elucigene CF-EU2™ firmy Elucigene Diagnostics, Citylabs, Manchester, Spojené Království). Jednotlivé „cutoff“ hodnoty a konfirmační kritéria uvádí příslušné kapitoly (1.4.2, 1.4.3, 1.4.4).

Pro detekci aminokyselin a acylkarnitinů u dědičných metabolických poruch (PKU/HPA, MCADD, LCHADD, VLCADD, MSUD, GA I, IVA, CPTD I, CPTD II a CACTD a od roku 2016 též ARG, CIT, CBSD HCU a MTHFRD HCU) bylo

využito MS/MS (Pourfarzam M. et Zadhoush F., 2013) s kity MassChrom®, derivatizujícími a nederivatizujícími esejemi firmy Chromsystems (Grafelfing, Německo) a MS/MS nástroji API2000TM, API3200TM, API 4000TM firmy AB Sciex (Praha, ČR). Při této metodě docházelo k detekci nabitých částic (iontů), které vznikaly při ionizaci, a následně k analýze jejich hmotnostního spektra. Díky tomu bylo možno měřit koncentrace jednotlivých detekovaných látek. Pacienti s BTD byli detekováni fluorimetrickou metodou, která byla založena na principu fotoluminiscence. „Cutoff“ hodnoty (Tab. 4) a jednotlivá konfirmační kritéria (Tab. 5) u screenovaných poruch metabolismu jsou uvedeny v kapitole 1.4.1.

Metodika MS/MS kromě cílových metabolických poruch zachytila dalších přibližně dvacet nemocí, které však nespĺňujú Wilsonova a Jungnerova kritéria zařazení do celoplošného screeningového programu (Tab. 1), např. deficit vitamínu B12, hydroxyprolinémie či argininjantarová acidurie (Pešková K., Chrastina P. et al., 2018).

Konkrétní statistické metody jsou uvedeny v jednotlivých kapitolách u daných publikací (kapitoly 4.1.1, 4.2.1, 4.3.1, 4.4.1).

4. PUBLIKACE

Kapitola shrnuje čtyři zásadní publikace autora týkající se tématu dizertační práce. Ke každé publikaci je uveden rozbor řazený v podkapitolách Úvod k publikaci, Výsledky a diskuze, Závěr. Původní znění originálních článků jsou zařazena v příloze této dizertační práce.

První publikace „*Epidemiology of Rare Diseases Detected by Newborn Screening in the Czech Republic*“ uvádí poznatky z epidemiologického hodnocení výsledků NLS v ČR z let 2010–2017 (kapitola 4.1).

Druhá publikace „*Neonatal Screening in the Czech Republic: Increased Prevalence of Selected Diseases in Low Birthweight Neonates*“ přináší poznatky ohledně výskytu screenovaných nemocí ve skupině novorozenců s NPH (kapitola 4.2).

Třetí publikace s názvem „Falešná pozitivita v novorozeneckém screeningu deficitu 21-hydroxylázy“ hodnotí FP a hledá cesty k jejímu snížení (kapitola 4.3).

Poslední, čtvrtá publikace, s názvem „Postup u pacienta s podezřením na deficit 21-hydroxylázy zachyceného v novorozeneckém screeningu v ČR“ se věnuje shrnutí nejnovějších informací v diagnostickém procesu novorozenců zachycených v NLS deficitu 21-hydroxylázy (kapitola 4.4).

4.1 Epidemiology of Rare Diseases Detected by Newborn Screening in the Czech Republic

Cítace: DAVID, Jan, Petr CHRASTINA, Karolina PEŠKOVÁ, Viktor KOŽICH, David FRIEDECKÝ, Tomáš ADAM, Eva HLÍDKOVÁ, Hana VINOHRADSKÁ, Dana NOVOTNÁ, Monika HEDELOVÁ, Eva AL TAJI, Andrea HOLUBOVÁ, Veronika SKALICKÁ, Milan MACEK, Renata GAILLYOVÁ a Felix VOTAVA. Epidemiology of Rare Diseases Detected by Newborn Screening in the Czech Republic. *Central European Journal of Public Health*. IF 0,8 (v tisku).

4.1.1 Úvod k publikaci

Cílem této publikace bylo vyhodnotit epidemiologická data o RD detekovaných NLS v ČR. Sledované období (2010–2017) zahrnovalo 888 891 novorozenců, což odpovídalo 100 % všech narozených dětí v daném období (ČSÚ, 2018). Tato data umožnila porovnat celkovou (kumulativní) prevalenci zachycených pacientů, vyhodnotit FP a PPV, jak souhrně, tak u jednotlivých screenovaných nemocí.

Suché krevní kapky byly v centrálních screeningových laboratořích (v Praze, Brně a Olomouci) analyzovány za využití metod imunofluorescence, MS/MS a fluorimetrie. V případě zjištění koncentrace analytu pod „cutoff“ hodnotou byl výsledek považován za negativní a novorozenec nebyl dále vyšetřován. Při pozitivní hodnotě analytu byl jedinec předán ke konfirmační diagnostice, léčbě a dalšímu sledování příslušnému klinickému pracovišti. Při nejasném výsledku v tzv. „šedé zóně“, kdy hodnota analytu byla mezi „cutoff“ hodnotou a jednoznačnou pozitivitou, se odběr suché krevní kapky opakoval. Počet pozitivních nálezů a opakovaných odběrů s konečným negativním výsledkem byl vyjádřen jako tzv. frekvence falešné positivity („False Positivity Rate“, FPR), tedy podíl počtu falešně pozitivních a počtu celkem negativních jedinců. Naopak PPV vyjadřovala poměr počtu nemocných zachycených screeningovým testem k celkovému počtu jedinců hodnocených testem jako pozitivní.

4.1.2 Výsledky a diskuze

Data prokázala vyšší prevalenci BTD v české populaci, na druhé straně nižší výskyt pro MSUD, IVA, CBSD HCU, MCADD a VLCADD (Tab. 8). Toto srovnání a obecné zhodnocení je však obtížné vzhledem k možnému statistickému efektu „malých čísel“ (vyjma MCADD). Za celou dobu fungování NLS nebyl detekován žádný pacient s CPTD I, CPTD II/CACTD, ARG, CIT a MTHFR HCU (Tab. 8).

Překvapivým nálezem byla nižší prevalence CF (1:6 536) než uváděly dosud publikované studie založené na klinickém pozorování ještě před zahájením celoplošného NLS v ČR (1:2 700, Várová V., Zemková D. et al., 2006). Tento fakt lze vysvětlit zlepšující se prenatální diagnostikou a informovaností všeobecné veřejnosti o CF a plánovaném rodičovství.

Zlepšující se schopnost celého systému NLS v ČR detekovat pacienty s vrozeným RD prokázala kumulativní prevalence záchytů, která z původních 1:2 701 (období 2002–2005) vzrostla na 1:1 043 ve sledovaném období 2010–2017 (Tab. 8).

Celkový počet screenovaných nemocí zařazených do NLS v ČR byl ve srovnání s ostatními evropskými zeměmi nadprůměrný (Loeber J., Burgard P. et al., 2012). Na druhé straně, vysoká detekční schopnost tohoto systému přinesla vyšší počet opakovaných vyšetření suchých krevních kapek s celkovou FPR 0,64 %. FP představuje zátěž pro zdravou část populace a stigmatizuje vyšetřované děti a jejich rodiny (Franková V., Votava F. et al., 2014). V porovnání s ostatními screenovanými nemocemi vykazoval NLS deficitu 21-hydroxylázy nejvyšší FPR 0,42 %. Cestou k zlepšení tohoto parametru by mohlo být začlenění druhého analytického kroku (Dhillon K., Ho T. et al., 2011) či změna hodnocení “cutoff” pro screeningové hodnoty 17OHP (viz kapitola 4.3). Druhou nejvyšší FPR představovala CF (0,11 %).

Tab. 8 Výsledky novorozeneckého screeningu v České republice v letech 2010–2017: screeningová prevalence, počet falešně pozitivních (FP), frekvence falešné positivity (FPR) a pozitivní prediktivní hodnota (PPV)

Nemoc	Počet potvrzených pacientů (n)	Screeningová prevalence	Počet FP (n)	FPR (%)	PPV
Fenylketonurie/ hyperfenylalaninémie	161	1:5 521	238	0,0268	0,40
Kongenitální hypotyreóza	309	1:2 877	197	0,0222	0,61
Deficit 21-hydroxylázy	71	1:12 520	3 696	0,4158	0,02
Cystická fibróza	136	1:6 536	967	0,1088	0,12
Deficit dehydrogenáz acyl-CoA se středně dlouhým řetězcem	40	1:22 222	17	0,0019	0,70
Deficit dehydrogenáz 3-hydroxyacyl-CoA s dlouhým řetězcem	11	1:80 808	4	0,0004	0,73
Deficit dehydrogenáz acyl-CoA s velmi dlouhým řetězcem	4	1:222 223	62	0,0070	0,06
Deficit karnitinpalmitoyl-transferázy I	0	-	29	0,0033	-
Deficit karnitinpalmitoyl-transferázy II/ deficit karnitinacylkarnitin-translokázy	0	-	2	0,0002	-
Leucinóza	3	1:296 297	90	0,0101	0,03
Glutarová acidurie, I	5	1:177 778	29	0,0033	0,15
Izovalerová aciduria	5	1:177 778	75	0,0084	0,06
Argininémie	0	-	1	0,0006	-
Citrulinémie	0	-	10	0,0055	-
Deficit biotinidázy	21	1:8 638	34	0,0187	0,38
Homocystinurie při deficitu cystathionin beta-syntázy	1	1:181 396	10	0,0055	0,09
Homocystinurie při deficitu metylentetrahydrofolát reductázy	0	-	3	0,0017	-
Celkem	767	1:1 043	5 464	0,6387	0,12

Zdroj: vlastní

Za zmínku stojí též FN nálezy, které byly nejvíce zastoupené u CF (Tab. 9). Jedná se o pacienty, kteří unikli NLS CF. Za hlavní příčinu lze pokládat nižší hodnoty screeningového IRT u novorozenců s mekoniovým ileem (40 % ze všech známých FN nálezů u CF) a vzácné patogenní mutace *CFTR* genu. “Biologická” prevalence CF po započtení patnácti FN nálezů ve sledovaném období činila 1:5 887. FN v NLS akcentuje fakt, že negativní screeningový nález nevylučuje danou nemoc v diferenciálně-diagnostickém rozhodování. Ke snížení počtu FN nálezů a zvýšení senzitivity NLS CF může vést detailnější DNA analýza

CFTR genu a/nebo zařazení dalšího analytického kroku. Tím může být vyšetření tzv. proteinu asociovaného s pankreatitidou (“*Pancreatitis-associated Protein*”, PAP) v originální suché krevní kapce (Krulišová V., Balaščaková M. et al., 2012).

Tab. 9 Přehled známých falešně negativních nálezů v novorozeneckém laboratorním screeningu cystické fibrózy v období 2010-2017

IRT (µg/l)	Hlavní příznak, který vedl k určení diagnózy	Věk (měsíce)	Mutace genu <i>CFTR</i>
62,2	Mekoniový ileus	1	F508del/F508del
107	Neprospívání	1	4259del5/Q552X (vzácná mutace)
61,0	Neprospívání, respirační infekce, anémie	5	F508del/F508del
79,7	Neprospívání, minerálová dysbalance	29	3142del9/P5L (vzácná mutace)
54,2	Mekoniový ileus, podezření již z prenatálního screeningu	1	F508del/CFTRdel2.3v
54,1	Mekoniový ileus	1	F508del/F508del
31,2	Pozitivní rodinná anamnéza	29	F508del/2789+2insA
55,6	Neprospívání, hepatopatie	10	F508del/G542X
58,3	Respirační infekce	28	N1303K/3849+10kbC>T
46,7	Mekoniový ileus	1	CFTRdel2.3/CFTRdel2.3
30,8	Mekoniový ileus, pneumonie	2	F508del/F508del
45,2	Rektální prolaps	28	F508del/F508del
36,0	Mekoniový ileus	1	F508del/G542X
30,3	Mekoniový ileus, podezření již z prenatálního screeningu	1	F508del/F508del
51,3	Pozitivní rodinná anamnéza	7	N1303K/3849+10kbC>T

Zdroj: vlastní

Postupné rozšiřování NLS koresponduje s vědeckým a technickým pokrokem. S tím však souvisí problémy nejen odborné, ale i etické, ekonomické a politické či legislativní. Wilsonova a Jungerova obecná kritéria pro screeningové programy z roku 1968 (Tab. 1) jsou dosud užívána, ale též relativizována. Na základě výsledků dotazníkové studie z let 2010 až 2011 (Burgard P., Rupp K. et al., 2012) vydala evropská síť odborníků v oblasti NLS („*European Network of Experts on Newborn Screening*“, EUNENBS) seznam 26 doporučených nemocí, které považuje za vhodné k zařazení do spektra NLS v evropských státech. Toto doporučení rozděluje nemoci na skupinu základní (potřebnou) s vysokou prevalencí, základní s nízkou prevalencí a skupinu kandidátní.

Do poslední jmenované skupiny, tedy kandidátní, jsou zařazeny i primární poruchy imunity, z nichž se v ČR v současné době metodicky připravuje studie NLS těžké kombinované imunodeficiency (SCID, Svatoň M., Šedivá A. et al., 2012). Principem by mohlo být screeningové vyšetření ze suchých krevních kapek na přítomnost excisních kroužků genové rekombinace segmentů pro imunoglobuliny (tzv. KREC) a T-buněčné receptory (tzv. TREC) metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce na úrovni DNA (Barbaro M., Ohlsson A. et al., 2017). Tímto vyšetřením lze vyloučit většinu vrozených těžkých kombinovaných imunodeficitů a dalších defektů imunity s výraznou poruchou novotvorby T nebo B lymfocytů. Problémem je však vysoká cena, vysoká FP a skutečnost potřeby tohoto screeningového programu, zda-li opravdu selhává klinická diagnostika těžkých primárních imunodeficitů v praxi.

Další kandidátní nemoci, které by mohly být zařazeny do NLS, jsou některá vrozená neuromuskulární onemocnění, jako např. spinální muskulární atrofie či dystrofinopatie (Ross L., Clarke A., 2017). Vzhledem k možnosti kauzální terapie, která však musí být zahájena presymptomaticky, se tyto nemoci jeví jako ideální k zařazení do screeningového programu. Problémem však zůstává absence detekčního krevního markeru. V úvahu přichází DNA analýza suchých krevních kapek, jejíž celoplošné provádění pro potřeby NLS však zatím česká legislativa znemožňuje (Zákon č. 373/2011 Sb., o specifických zdravotních službách).

4.1.3 Závěr

NLS v ČR představuje účinný nástroj včasné diagnostiky závažných RD a naplňuje tak evropské i české směrnice o RD s cílem zlepšit jejich diagnostiku a včasnou léčbou též kvalitu života postižených jedinců. Jeho současná úroveň byla charakterizována vzrůstající detekční schopností a odpovídala mezinárodním standardům vyspělých států Evropské unie. Další optimalizace systému NLS jsou však potřebné a jsou předmětem výzkumu. Jsou hledány analytické stupně s cílem snížení FP, zvažují se možnosti rozšíření spektra screenovaných nemocí (SCID) a diskutují se „cutoff“ hodnoty vzhledem k detekci tranzientních či mírných forem (např. u CH, CF či deficitu 21-hydroxylázy).

Výskyt FN nálezů zdůraznil fakt, že negativní screeningový výsledek nevylučuje danou nemoc při diferenciálně-diagnostické rozvaze. Naopak FP nálezy poukázaly na to, že NLS je pouze metoda vyhledávací, nikoli konfirmační.

4.2 Neonatal Screening in the Czech Republic: Increased Prevalence of Selected Diseases in Low Birthweight Neonates

Citace: DAVID, Jan, Petr CHRASTINA, Hana VINOHRADSKÁ, Eva ALTAJI, Andrea HOLUBOVÁ, Eva HLÍDKOVÁ, Viktor KOŽICH a Felix VOTAVA. Neonatal Screening in the Czech Republic: Increased Prevalence of Selected Diseases in Low Birthweight Neonates. *European Journal of Pediatrics*. 2018, **177**(11), 1697-1704. IF 2,242.

4.2.1 Úvod k publikaci

Dle oficiálních dat je trend nárůstu počtu novorozenců s NPH v posledních letech zřejmý. V roce 1975 bylo evidováno 6,20 % živě narozených novorozenců s NPH, v roce 1985 5,64 %, v roce 1995 5,48 %, v roce 2005 6,72 % a v roce 2015 7,76 % (ÚZIS ČR, 2017). Příčin je více, jednak zvyšování průměrného věku matek při porodu, s tím spojené jejich komorbidity, narůstající počet dětí narozených po umělém oplodnění a dětí narozených z vícečetných těhotenství, rozvoj medicíny či zlepšování perinatologické péče (Ananth C. et Vintzileos A., 2009). NPH a prematurita jsou obecně spojeny s vyšší morbiditou a mortalitou (McIntire D., Bloom S. et al., 1999). Cílem této práce bylo vyhodnotit prevalenci nemocí vyhledávaných pomocí systému NLS v ČR v letech 2002–2016 u novorozenců s NPH a normální porodní hmotností.

Sledované období od 1. 1. 2002 do 31. 12. 2016 zahrnovalo tři fáze postupného rozšiřování NLS. Vyšetřovány byly tzv. suché kapky krve na filtračním papíře (screeningové kartičky) odebírané z paty novorozenců a poštou zasílané do centrálních laboratoří. V první fázi (2002–2006) byly kapky odebírány pátý až sedmý den života novorozence, v druhé fázi (2006–2009) mezi 72. a 96. hodinou a ve třetí fázi (2009–2015) pak mezi 48. a 72. hodinou života novorozence. Za celé období 2002 až 2016 bylo vyšetřeno 1 277 283 novorozenců, což odpovídalo 100 % všech živě narozených dětí v ČR v daném období (ČSÚ, 2017).

Analýza screeningových kartiček spočívala ve změření koncentrace TSH pomocí fluoroimunoeseje pro detekci CH (Buyukgebiz A., 2006). Stejnou metodikou byl měřen 17OHP pro detekci deficitu 21-hydroxylázy (Votava F., Novotná D. et al., 2012) a IRT k detekci CF. U novorozenců s nejvyšším IRT byla provedena DNA analýza *CFTR* genu (Sommeburg O., Krulišová V. et al., 2014). Pomocí MS/MS byli novorozenci vyšetřeni na dědičné metabolické poruchy (Pourfarzam M. et Zadhoush F., 2013), tj. PKU/HPA, MCADD, LCHADD, VLCADD, MSUD, GA I, IVA, CPTD I, CPTD II a CACTD.

Novorozenci s pozitivním nálezem v NLS byli předáni navazujícímu klinickému pracovišti ke confirmaci diagnózy pomocí obecně uznaných diagnostických „zlatých standardů“ včetně molekulárních analýz a k následné léčbě (Metodický návod k zajištění novorozeneckého laboratorního screeningu a následná péče, MZ ČR, 2016). Zdrojem dat o počtu confirmovaných diagnóz u NLS detekovaných novorozenců byla zpětná hlášení klinických pracovišť screeningovým laboratorům.

Z výše uvedených dat byla retrospektivně statisticky porovnána prevalence jednotlivých screenovaných nemocí ve skupině novorozenců s normální porodní hmotností a s NPH. Míra asociace NPH, jako potenciálního rizikového faktoru dané nemoci, byla vyjádřena pomocí poměru šancí („*Odds Ratio*“, OR) s 95% konfidenčním intervalem („*Confidence Interval*“, CI), statistická významnost byla hodnocena chí-kvadrát testem s Fisherovou korekcí (pro korekci souborů s nízkou frekvencí výskytu nemocí v kontingenční tabulce).

4.2.2 Výsledky a diskuze

Ve skupině novorozenců s NPH měly vyšší prevalenci pouze tři screenované nemoci. Statisticky významný byl výsledek u CH (OR 2,50, CI 1,92; 3,25) a CF (OR 2,44, CI 1,51; 3,94). U LCHADD lze o statisticky významném výsledku hovořit pouze částečně (OR 7,74, CI 2,18; 27,42), neboť široký CI nezaručuje vysokou validitu výsledku, i když byla významnost Fisherovým testem potvrzena. U ostatních screenovaných nemocí neměla porodní hmotnost

novorozenců vliv na jejich prevalenci, tj. u deficitu 21-hydroxylázy a souhrnně i jednotlivě (vyjma LCHADD) u dědičných metabolických poruch (Tab. 10).

Limitací studie byla absence dat o gestačním věku screenovaných a detekovaných novorozenců.

Tab. 10 Statistické vyhodnocení rozdílu prevalence u novorozenců s normální a nízkou porodní hmotností (období 2002–2016)

Nemoc	Odds ratio	95% konfidenční interval	Chi-kvadrát test	Fisherův test
Kongenitální hypotyreóza	2,50	1,92–3,25	< 0,001	-
Cystická fibróza	2,44	1,51–3,94	< 0,001	-
Deficit 21-hydroxylázy	1,07	0,52–2,21	0,852	-
Fenylketonurie/hyperfenylalaninémie	1,20	0,68–2,12	0,535	-
Deficit dehydrogenáz acyl-CoA se středně dlouhým řetězcem	0,68	0,16–2,84	-	0,448
Deficit dehydrogenáz 3-hydroxyacyl-CoA s dlouhým řetězcem	7,74	2,18–27,42	-	0,006
Glutarová acidurie, typ I	2,90	0,32–25,96	-	0,339

Zdroj: vlastní

Problematika dysbalancí tyreoidální osy u předčasně narozených dětí, resp. dětí s NPH, je velmi široká. Roli zde hraje řada tyreoidálních a extratyreoidálních faktorů (snížená sekrece tyreoliberinu, snížená odpověď štítné žlázy na stimulaci TSH, nezralé organifikační mechanismy štítné žlázy, snížená periferní konverze FT4 na trijódtyronin a další). Tyto dysbalance jsou často přechodné (Lee J., Kim S. et al., 2015). Vyšší prevalenci CH jako takové lze ve skupině novorozenců s NPH vysvětlit vyšším výskytem jejich tranzientních forem (Medda E., Olivieri A. et al., 2005) oproti novorozencům s normální porodní hmotností. Tento fakt zdůrazňuje význam reevaluace tyreoidální osy po třetím roce věku dle doporučení Evropské společnosti pro dětskou endokrinologii, zejména u dětí narozených s NPH a diagnostikovaných v NLS (Léger J., Olivieri A. et al., 2014). Z výše uvedeného lze odvodit, že CH jako taková nevede k předčasnému porodu a/nebo NPH.

CF může vést k alteraci intrauterinního růstu několika mechanismy. Fetálním faktorem může být pankreatická insuficience (Muller A., Thamm B. et al., 1999),

maternálním faktorem pak exprese patologického CFTR proteinu na maternální straně placenty způsobující její insuficienci (Mylona P., Glazier J. et al., 1996). Důsledkem pak může být malnutrice plodu.

Z dědičných metabolických vad byla prokázána NPH jako rizikový faktor pouze pro LCHADD, tato korelace nebyla toho času v dostupné literatuře popsána. Nabízí se vysvětlení, že ženy přenašečky pro LCHADD s homozygotním plodem pro LCHADD mají v posledním trimestru vyšší výskyt komplikací (akutní těhotenské hepatózy), což vede k předčasnému ukončení gravidity (Strauss A., Bennett M. et al., 1999).

NPH nebyla asociovaná s vyšší prevalencí deficitu 21-hydroxylázy. Tento fakt může být nápomocný při rozhodování o problematických „cutoff“ hodnotách 17OHP u novorozenců s NPH a vést ke zlepšení parametrů NLS deficitu 21-hydroxylázy, tedy ke snížení FPR a zvýšení PPV (Anandi S. et Shaila B., 2017).

4.2.3 Závěr

Ve skupině novorozenců s NPH byl prokázán vyšší výskyt CH, CF a LCHADD. Z výše uvedených dat lze vyvodit dvě kauzality. První kauzalitou je vliv prematurity, resp. NPH, na funkci štítné žlázy, což potvrzují data o vyšší prevalenci tranzientních forem CH ve skupině novorozenců s NPH. Druhá kauzalita je opačná, ukazuje na primární vliv genetické poruchy plodu, která vede k prematuritě a NPH. Lze tedy říct, že NPH je jednou z manifestací CF a LCHADD a může být tak první známkou dané nemoci.

Výsledky akcentují význam reevaluace tyreoidální osy po třetím roce věku u dětí narozených s NPH a diagnostikovaných v NLS CH.

Novorozenci s NPH zasluhují vyšší pozornost, nejen kvůli patologiím, které sama o sobě NPH přináší, ale též proto, že mají vyšší riziko manifestace CH, CF a LCHADD.

4.3 Falešná pozitivita v novorozeneckém screeningu deficitu 21-hydroxylázy

Citace: DAVID, Jan, Monika HEDELOVÁ a Felix VOTAVA. Falešná pozitivita v novorozeneckém screeningu deficitu 21-hydroxylázy. *Česko-slovenská Pediatrie (v tisku)*.

4.3.1 Úvod k publikaci

Ideální screeningový test je charakterizován vysokou senzitivitou i specificitou. U každé laboratorní metody je snaha tyto parametry vybalancovat, avšak FP a FN nálezy nelze nikdy eliminovat. Právě FP a FN jsou hlavními riziky NLS.

Deficit 21-hydroxylázy je ze všech screenovaných nemocí v ČR zatížen nejvyšší FPR (0,42 %, kapitola 4.1.2). Tento fakt je dán metodikou stanovení 17OHP, neboť imunofluorescence je spojena s vysokou FPR a tím nižší PPV (Minutti C., Lacey J. et al., 2004). FP představuje stigmatizaci zdravých novorozenců a zátěž pro jejich rodiny (Franková V., Votava F. et al., 2014). Cílem této práce bylo zhodnotit FP při hodnocení screeningových hodnot 17OHP dle „cutoff“ vztažených vůči gestačnímu věku novorozence, oproti v současné době používané porodní hmotnosti.

Do analýzy bylo zahrnuto 129 175 dětí narozených v období 2015–2017 v regionu Čechy, což odpovídalo cca 60 % všech narozených dětí v daném regionu za sledované období (ČSÚ, 2018). Data o porodní hmotnosti a gestačním věku novorozenců byla získána ze screeningových kartiček, které byly zasílány běžnou poštou do centrální screeningové laboratoře pro danou oblast v Praze.

Z této skupiny byli detekováni novorozenci s dohledatelným údajem o gestačním věku a se screeningovou hodnotou 17OHP nad „cutoff“ dle porodní hmotnosti. U osmnácti novorozenců se diagnóza deficitu 21-hydroxylázy potvrdila. Statistickou metodou „*Adjusted Wald Interval for a Difference of Proportions with Matched Pairs*“ (software R program) byla srovnána FPR

v souboru novorozenců zachycených dle porodní hmotnosti a dle gestačního věku. Konfirmační diagnostika deficitu 21-hydroxylázy spočívala ve stanovení 17OHP ze žilní krve a průkazu patogenních mutací v genu *CYP21A2*, event. v diferenciálně diagnostických nejasnostech v provedení ACTH (adrenokortikotropní hormon) stimulačního testu.

4.3.2 Výsledky a diskuze

Ve všech sledovaných letech došlo k významnému snížení FPR při hodnocení 17OHP dle gestačního věku (FPR 0,23 %) oproti porodní hmotnosti (FPR 0,30 %). Zároveň neklesla senzitivita tohoto testu (Tab. 11). Statistická významnost byla potvrzena metodou „*Adjusted Wald Interval for a Difference of Proportions with Matched Pairs*“, neboť odhadovaný parametr testovací statistiky ležel v 95% CI a nepokrýval nulu (Tab. 12).

Tab. 11 Zachycení a konfirmování novorozenci ve screeningu deficitu 21-hydroxylázy v období 2015–2017

Parametr		2015	2016	2017	Celkem
Celkem analyzováno dětí		42 542	43 276	43 357	129 175
Počet konfirmovaných pacientů		7	6	5	18
Porodní hmotnost	Počet zachycených dětí	137	116	158	411
	Počet falešně pozitivních dětí	130	110	153	393
	Frekvence falešné positivity	0,0031	0,0025	0,0035	0,0030
Gestační věk	Počet zachycených dětí	104	86	123	313
	Počet falešně pozitivních dětí	97	80	118	295
	Frekvence falešné positivity	0,0023	0,0018	0,0027	0,0023

Zdroj: vlastní

NLS deficitu 21-hydroxylázy v zahraničí vykazuje vysokou efektivitu (Tsuji A., Konishi K. et al., 2015). Gestační věk a porodní hmotnost nepřímo úměrně korelují s hodnotou 17OHP (Gruñeiro-Papendieck L., Prieto L. et al., 2001) a FPR (Slaughter J., Meinzen-Derr J. et al., 2010). Porodní hmotnost lze považovat za parametr objektivnější a spolehlivější. Naopak délka gestace je méně

objektivní parametr, neboť se odhaduje, avšak lépe koreluje s hodnotami 17OHP (Van der Kamp H., Oudshoorn C. et al., 2005).

Tab. 12 Statické vyhodnocení významnosti rozdílu frekvencí falešné positivity v jednotlivých letech (porodní hmotnost versus gestační věk) v období 2015–2017, metoda „Adjusted Wald Interval for a Difference of Proportions with Matched Pairs“

	2015	2016	2017	Celkem
Odhad	0,000776	0,000693	0,000807	0,000759
95% interval spolehlivosti	0,000507; 0,001044	0,000441; 0,000945	0,000536; 0,001078	0,000608; 0,000910

Zdroj: vlastní

Výsledky této studie prokázaly statisticky významný pokles FPR při hodnocení 17OHP vůči gestačnímu věku. Potvrzují tak již dříve publikovaná data, u kterých však bylo sledování provedeno na menším vzorku dětí (Torresani T., Gruters A. et al., 1994). FP představuje psychickou zátěž zejména pro rodiče novorozenců s pozitivními nálezy. Dalším významným důsledkem je též vyšší nákladovost screeningového programu daná opakováním vyšetření. Zavedení nových „cutoff“ screeningových hodnot pro 17OHP může tyto negativní důsledky eliminovat. Zároveň je nutné uvést, že nejefektivnějším nástrojem pro snížení FP je použití druhostupňových analýz přímo v originální suché krevní kapce. V tomto ohledu je v současné době nejvýhodnější stanovení profilu dalších steroidů pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie spojené s kapalinovou chromatografií – tzv. LC-MS/MS (Fiet J., Le Bouc Y. et al., 2017). Tento postup je v ČR připravován.

Za zmínku stojí též FN v NLS deficitu 21-hydroxylázy. FN nálezy se mohou objevit z důvodů technické či logistické chyby při odběru, nejčastější příčinou jsou však klinicky mírné formy nemoci. Z celého období fungování NLS deficitu 21-hydroxylázy v ČR (2006–2017) je známo šest pacientů (dva s klasickou formou a čtyři s neklasickou formou) s hodnotou 17OHP pod „cutoff“ (Tab. 13). U jednoho pacienta se však jednalo o „nepravou“ FN, protože před odběrem suché krevní kapky byl léčen kortikoidy, u zbývajících pacientů šlo o skutečnou „biologickou“ FN. Z výše uvedeného vyplývá již dříve zmiňovaná skutečnost,

že negativní screeningový výsledek obecně (nejen u deficitu 21-hydroxylázy) nevylučuje danou nemoc z diferenciálně-diagnostické rozvahy.

Tab. 13 Přehled pacientů s deficitem 21-hydroxylázy, které novorozenecký screening v období 2006–2017 nedetekoval (známé falešně negativní nálezy)

Pacient	Rok narození	Věk při diagnóze	Genotyp (lehčí alela)	Poznámka
1	2006	10 dní	p.R357Q	Diagnóza stanovena na základě virilizace (Prader III)
2	2006	8 let	p.V282L	Diagnóza stanovena na základě pubarché praecox
3	2008	7,5 roku	p.V282L	Diagnóza stanovena na základě pubarché praecox
4	2008	7,2 roku	p.V282L	Diagnóza stanovena na základě pubarché praecox
5	2009	1 den	c.293-13C>G	<i>Pouze "laboratorní" falešná negativita, odběr screeningu na léčbě hydrokortizonem</i>
6	2013	1 měsíc	p.V282L	Diagnóza stanovena dle rodinné anamnézy

Zdroj: vlastní

4.3.3 Závěr

Hodnocení screeningových hodnot 17OHP vůči gestačnímu věku je proveditelné v systému NLS v ČR a vede ke snížení FPR u deficitu 21-hydroxylázy. Tím může dojít ke snížení negativního dopadu a stigmatizace zdravé části populace, tak i nákladovosti celého screeningového programu. Výstupy se uplatní v laboratorní i klinické praxi.

4.4 Postup u pacienta s podezřením na deficit 21-hydroxylázy zachyceného v novorozeneckém screeningu v ČR

Citace: DAVID, Jan a Felix VOTAVA. Postup u pacienta s podezřením na deficit 21-hydroxylázy zachyceného v novorozeneckém screeningu v ČR. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie a výživa*. 2017, **20**(4), 206–210.

4.4.1 Úvod k publikaci

Smyslem NLS deficitu 21-hydroxylázy, je včasným záchytem a včasnou léčbou zabránit rozvoji život ohrožující solné krize u nejtěžších forem onemocnění a vzniku předčasné pseudopuberty s deficitem dospělé výšky u lehčích forem (Votava F., Novotná D. et al., 2012). Od roku 2006, kdy v ČR probíhá toto celoplošné vyhledávání, žádný zachycený pacient neprodělal klinicky manifestní solnou krizi (viz dále). Doposud však neexistoval standardizovaný postup u pacienta zachyceného v NLS deficitu 21-hydroxylázy. Cílem práce bylo shrnout nejnovější poznatky a vytvořit takový diagnostický postup.

Deficit 21-hydroxylázy je charakterizován absolutním či relativním nedostatkem kortizolu. Zpětnovazebným mechanismem pak dochází ke zvýšení sekrece ACTH, který stimuluje steroidogenezi a akumulaci steroidů před enzymatickým blokem. Některé z těchto steroidů mají androgenní aktivitu a zvýšeně se syntetizují i samotné androgeny (Lebl J., 2012). V organismu vzniká hypokortizolismus, hypoaldosteronismus a hyperandrogenismus. Fenotypové klinické projevy a závažnost deficitu 21-hydroxylázy lze chápat jako kontinuum ve vztahu ke zbytkové aktivitě 21-hydroxylázy dané primárně typem mutace v genu *CYP21A2*. Korelace genotypu a fenotypu, až na výjimky, je u této nemoci signifikantní (Sperling M., 2002). Právě na základě této zbytkové aktivity lze deficit 21-hydroxylázy rozdělit do čtyř fenotypů (klasická forma se solnou krizí, přechodná forma či prostá virilizující a neklasická pozdně nastupující forma).

U nejtěžších forem se chlapci rodí pouze se známkami zejména skrotální hyperpigmentace a zvětšením penisu. Mezi druhým a pátým týdnem života se rozvíjí metabolický rozvrat v důsledku nadledvinové nedostatečnosti, tzv. solná krize. U dívek lze navíc pozorovat virilizaci genitálu různého stupně. Nejvyšší stupeň virilizace může vést k chybnému určení pohlaví. U lehčích forem dominuje předčasná pseudopuberta s růstovou akcelerací a předčasným pubarché. Neklasická forma se manifestuje v pozdějším věku, většinou v období puberty nebo až v dospělosti, známkami hyperandrogenizmu.

NLS deficitu 21-hydroxylázy spočívá ve stanovení koncentrace 17OHP v suché krevní kapce odebrané novorozencům mezi 48. až 72. hodinou života. Dodržení tohoto intervalu je významné vzhledem k fyziologicky vyšším hodnotám 17OHP v prvních dnech života novorozence, což je dáno vyšší aktivitou enzymatického aparátu fetální kůry nadledvin (Van Der Kamp H., Oudshoorn C. et al., 2005). 17OHP je stanoven imunofluorescenční metodou, jejíž nevýhodou je relativně vysoká FPR a tím nižší PPV. Hodnota PPV by se mohla navýšit po zařazení dalšího diagnostického kroku, a to LC-MS/MS. Výsledky z jiných zahraničních screeningových programů ukazují, že právě zařazení této metody jako druhého stupně NLS deficitu 21-hydroxylázy zvýší PPV a sníží FPR (Speiser P., Azziz R. et al., 2010).

4.4.2 Výsledky a diskuze

Interpretace screeningových hodnot 17OHP je komplikovaná, závislá na postnatálním věku při odběru, gestačním věku, porodní hmotnosti novorozence a jeho aktuální klinické situaci, tj. stimulaci ACTH osy, např. hypoxií, septickým stavem či intrakraniálním krvácením (Anandi S. et Shaila B., 2017). Pro praktické rozhodování byla interpretace hladin rozdělena do tří kategorií (Tab. 14), tedy jednoznačná negativita (tj. pod „cutoff“ hodnotou), jednoznačná pozitivita a „šedá“ nejednoznačná zóna mezi jednoznačnou pozitivitou a negativitou (Blankenstein O., Stopsack M. et al., 2009).

Tab. 14 Interpretace screeningových hodnot 17-hydroxyprogesteronu (17OHP):
„cutoff“ hodnoty (nmol/l)

Gestační věk (týdny)	Porodní hmotnost (g)	„Cutoff“ hodnoty pro jednoznačnou negativitu				Jednoznačná pozitivita
		Věk při odběru (dny)				
		2	3	4–6	7	Bez ohledu na věk
≤ 27	< 900	160	137	129	141	200
28	900–1 099	137	117	110	121	180
29	1 100–1 299	117	100	94,0	103	150
30	1 300–1 499	99,0	85,0	80,0	88,0	120
31	1 500–1 699	84,0	71,0	67,0	74,0	95,0
32	1 700–1 899	70,0	60,0	56,0	62,0	90,0
33	1 900–2 099	57,0	49,0	46,0	51,0	85,0
34	2 100–2 299	46,0	40,0	37,0	41,0	80,0
35	2 300–2 499	37,0	31,0	30,0	32,0	70,0
36	2 500–2 699	30,0	30,0	25,0	26,0	60,0
≥ 37	≥ 2 700	23,0	20,0	20,0	20,0	60,0

Zdroj: upraveno dle Blankenstein O., Stopsack M. et al., 2009

Nejednoznačný nález v „šedé“ zóně a bez jiných klinických okolností vedoucích ke zvýšenému podezření na deficit 21-hydroxylázy se řeší opakováním odběru suché krevní kapky s časovým odstupem jednoho až dvou týdnů od posledního náběru („Recall“ na základě výzvy screeningové laboratoře). Opakované odběry se musí provádět i z indikace klinických okolností novorozence, při hladinách 17OHP pod „cutoff“. Jedná se o tzv. rescreening a indikace jsou taxativně určeny v Metodickém návodu MZ ČR (Metodický návod k zajištění novorozeneckého laboratorního screeningu a následná péče, MZ ČR, 2016).

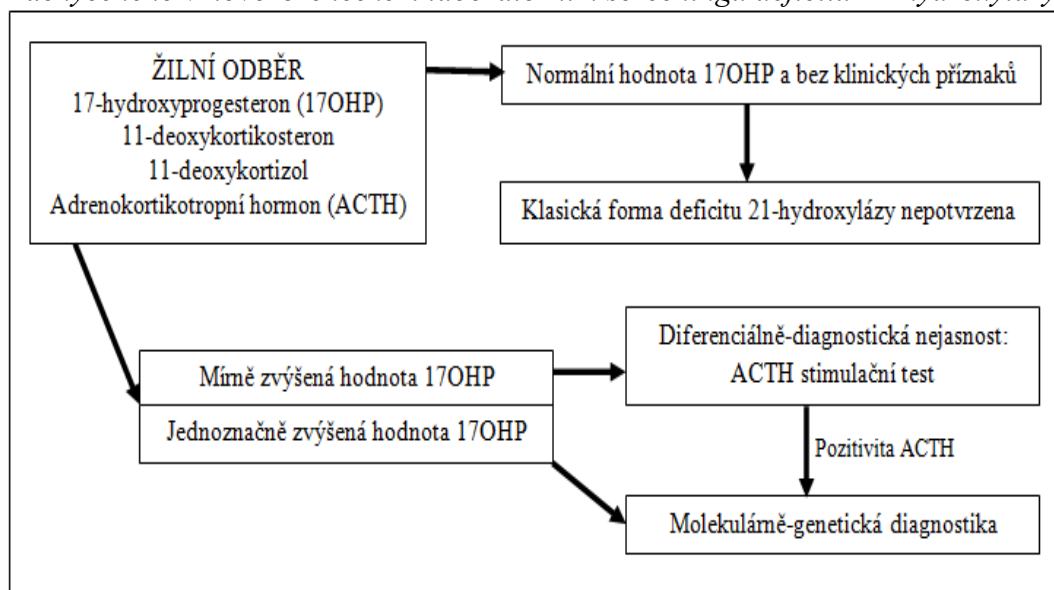
Dle výsledků z kapitoly 4.2.2 nebyla NPH asociovaná s vyšší prevalencí deficitu 21-hydroxylázy. Tento fakt může být nápomocný při rozhodování o problematických hraničních „cutoff“ hodnotách 17OHP u novorozenců s NPH.

V případě jednoznačné positivity či přetrvávání hodnot 17OHP v „šedé“ zóně se musí provést konfirmační diagnostika. Screening je metoda vyhledávací, nikoliv konfirmační. Naléhavost konfirmačního vyšetření může být časově bezodkladná, např. v případě zralého novorozence s hladinou 17OHP v pásmu

jednoznačné positivity; nebo časově méně naléhavá v případě nezralého novorozence s přetrváváním hladin 17OHP v „šedé“ zóně.

Konfirmace diagnózy spočívá zejména v biochemické a molekulárně-genetické diagnostice (Obr. 3). Pro klasickou formu je typicky zvýšená jak hodnota sérového 17OHP, tak plazmatická koncentrace ACTH. U neklasické formy mohou být hodnoty 17OHP v novorozeneckém období ve fyziologickém rozmezí. Extrémně důležitý je odběr vzorku na vyšetření steroidního spektra před eventuálním nasazením substituce hydrokortizonem. Při diferenciálně-diagnostických nejasnostech lze užít ACTH stimulační test, který zhodnotí funkci nadledvin (Falhammar H., Wedell A. et al., 2015).

Obr. 3 Zjednodušený algoritmus konfirmační diagnostiky u pacienta zachyceného v novorozeneckém laboratorním screeningu deficitu 21-hydroxylázy



Zdroj: vlastní

Molekulárně–genetická diagnostika nepatří v některých zemích mezi základní diagnostické metody, diagnózu však definitivně potvrdí. V ČR se uplatňuje u každého pacienta. V současné době jsou popsány desítky mutací genu *CYP21A2* (Tab. 15) a spektrum se stále rozšiřuje (Sarafoglou K., Hoffman G. et al., 2008, Dunnen JT., Dalgleish R. et al., 2018).

Tab. 15 Vztah fenotypu a genotypu CYP21A2 u deficitu 21-hydroxylázy

Klinická charakteristika choroby	Mutace genu CYP21A2
Klasická forma: nejtěžší fenotyp	Delece, chimérické geny či stop mutace, p.Q319*, p.I237N+p.V238E+p.M240K, c.923_924insT, p.R357W na obou alelách
Klasická forma: středně těžký fenotyp	c.293-13C>G na obou či lehčí alele
Klasická forma: středně lehký fenotyp	p.I173N na obou či lehčí alele
Přechodná klasická/neklasická forma: lehký fenotyp	p.V282L, p.P31L, p.P454S na obou či lehčí alele

Zdroj: upraveno dle Sarafoglou K., Hoffman G. et al., 2008, Dunnen JT., Dagleish R. et al., 2016

4.4.3 Závěr

Interpretace screeningových hodnot 17OHP je komplikovaná a závisí na postnatálním věku při odběru suché krevní kapky, dále na gestačním věku, porodní hmotnosti novorozence a jeho aktuální klinické situaci. Publikace shrnula nejnovější poznatky v diagnostice deficitu 21-hydroxylázy a slouží ke zlepšení tohoto procesu. Výstupy se uplatní v klinické praxi.

ZÁVĚRY

NLS je komplexní program sekundární prevence. Epidemiologické výsledky vyplývající z předkládané dizertační práce vyhodnotily NLS v ČR jako vysoce efektivní (kapitola 4.1). Tento systém byl charakterizován vysokou detekční schopností, která odpovídala mezinárodním standardům vyspělých států Evropské unie. Vyhodnocení dat umožnilo též objektivizovat prevalenci RD detekovaných tímto screeningovým programem. NLS v ČR tak představuje účinný nástroj včasné detekce závažných RD a umožňuje naplňovat Doporučení Rady Evropské unie a Usnesení Vlády ČR o strategii pro RD.

Data o porodní hmotnosti a výskytu screenovaných a detekovaných novorozenců umožnila stanovit prevalenci daných nemocí u pacientů s NPH (kapitola 4.2). V této skupině byl prokázán vyšší výskyt CH, CF a LCHADD. Z těchto dat lze vyvodit dvě kauzality. První kauzalitou je vliv prematurity a NPH na tyreoidální funkce u novorozenců. Zdůrazňuje tak význam reevaluace tyreoidální osy po třetím roce života u novorozenců s NPH zachycených v NLS. Druhá kauzalita je opačná, ukazuje na primární vliv genetické poruchy plodu, která vede k prematuritě a NPH. Novorozenci s NPH tak zasluhují vyšší pozornost, nejen kvůli patologiím, které sama o sobě NPH přináší, ale též proto, že mají vyšší riziko manifestace CH, CF a LCHADD.

Dalším významným výstupem této dizertační práce byl nástroj ke snížení FPR u NLS deficitu 21-hydroxylázy (kapitola 4.3). Hodnocení screeningových hodnot 17OHP vůči gestačnímu věku vedlo k signifikantnímu snížení FPR a je proveditelné v systému NLS v ČR. Benefit je evidentní, vede ke snížení negativního dopadu a stigmatizace zdravé části populace a ke snížení nákladovosti celého screeningového programu.

Závěrem byl vypracován diagnostický postup u novorozenců zachycených v NLS deficitu 21-hydroxylázy v ČR. Sdělení shrnuje aktuální poznatky v diagnostice deficitu 21-hydroxylázy a umožňuje tak zlepšení celého procesu (kapitola 4.4).

Výstupy této dizertační práce prokázaly, že NLS v ČR je vysoce efektivní a odpovídá mezinárodním standardům. Výsledky poukázaly i na slabé stránky screeningového programu a přinesly několik návrhů k jeho zlepšení. Výše uvedené výstupy se uplatní v laboratorní i klinické praxi.

SOUHRN

ÚVOD: Novorozenecký laboratorní screening je významný nástroj sekundární prevence, který díky včasné detekci pacientů umožní zahájení léčby ještě v asymptomatickém stádiu nemoci a zvýší tak kvalitu jejich života. Všechny nemoci vyhledávané tímto systémem v České republice splňují definici pro vzácná onemocnění, tj. populační frekvenci nižší než 1:2 000. Hodnocení efektivity screeningového programu je stěžejním krokem pro jeho zlepšování. Hlavním cílem této dizertační práce bylo vyhodnotit jak klinickou, tak především celopopulační efektivitu novorozeneckého laboratorního screeningu a optimalizovat bilanci mezi jeho detekční schopností a zátěží zdravé části populace.

METODOLOGIE: Ke zpracování této dizertační práce byla využita data z centrálních screeningových laboratoří v České republice. Do analýzy byli zahrnuti novorozenci vyšetřeni v letech 2002–2017. Screeningové kartičky se suchými krevními kapkami byly analyzovány metodou imunoanalytickou, spektrometrickou a fluorimetrickou.

VÝSLEDKY: Výstupy této dizertační práce (1) umožnily objektivizovat prevalenci vzácných onemocnění v České republice, (2) objektivizovaly vztah prevalence screenovaných nemocí a porodní hmotnosti detekovaných novorozenců, (3) navrhly změnu hodnocení „cutoff“ hodnot u deficitu 21-hydroxylázy, která vedla ke snížení jeho vysoké falešné pozitivivity a zátěže zdravé části populace, (4) shrnuly postupy u pacienta detekovaného v novorozeneckém laboratorním screeningu deficitu 21-hydroxylázy k zlepšení celého diagnostického procesu.

ZÁVĚR: Novorozenecký laboratorní screening v České republice představuje účinný nástroj včasné diagnostiky závažných vzácných onemocnění a naplňuje tak evropské i české směrnice o vzácných onemocněních. Jeho současná úroveň odpovídá mezinárodním standardům ostatních vyspělých států Evropské unie. Výše uvedené výstupy se uplatní v laboratorní i klinické praxi.

SUMMARY

INTRODUCTION: Newborn laboratory screening is a process used for early detection and treatment of selected rare diseases which leads to improvement in patient quality of life. All diseases included in newborn laboratory screening are classified as rare diseases, defined by a population frequency less than 1:2 000. The evaluation of newborn laboratory screening is an important tool for its improvements. The main aim of this doctoral thesis was to evaluate clinical and population-wide efficacy and balance detection rate and impact on healthy part of population.

METHODS: The doctoral thesis was based on results from screening laboratories in period 2002–2017 in the Czech Republic. Dried blood spots from newborns were analyzed using fluorescence *immuno*-assay, tandem mass spectrometry and fluorimetry.

RESULTS: The outcomes of this doctoral thesis led (1) to objectify prevalence of rare diseases in the Czech Republic, (2) to objectify association between prevalence of screened diseases and newborn birthweight, (3) to propose the change of decision limits of screening of 21-hydroxylase deficiency with aim to decrease high false positivity and negative impact on health part of population, (4) to define recommendations for managing of patients screened as positive in the 21-hydroxylase deficiency newborn laboratory screening.

CONCLUSION: Newborn laboratory screening in the Czech Republic detects patients with rare diseases in the early preclinical stages and the level of this system corresponds with the standard used by many states of the European Union. The above mentioned outcomes will be used in laboratory and clinical practice.

PŘEHLED PUBLIKACÍ, PŘEDNÁŠEK A POSTERŮ

Publikace

Původní články s impakt faktorem (IF):

DAVID, Jan, Petr CHRASTINA, Hana VINOHRADSKÁ, Eva AL TAJI, Andrea HOLUBOVÁ, Eva HLÍDKOVÁ, Viktor KOŽICH a Felix VOTAVA. Neonatal screening in the Czech Republic: increased prevalence of selected diseases in low birthweight neonates. *European Journal of Pediatrics* [online]. 2018, **177**(11), 1697–1704. DOI: 10.1007/s00431-018-3230-y. ISSN 0340-6199. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00431-018-3230-y>. **IF 2,242**.

DAVID, Jan, Petr CHRASTINA, Karolína PEŠKOVÁ, Viktor KOŽICH, David FRIEDECKÝ, Tomáš ADAM, Eva HLÍDKOVÁ, Hana VINOHRADSKÁ, Monika HEDELOVÁ, Eva AL TAJI, Andrea HOLUBOVÁ, Veronika SKALICKÁ, Milan MACEK, Renata GAILLYOVÁ a Felix VOTAVA. Epidemiology of rare diseases detected by newborn screening in the Czech Republic. *Central European Journal of Public Health (v tisku)*. **IF 0,8**.

Původní články bez IF:

DAVID, Jan a Felix VOTAVA. Postup u pacienta s podezřením na deficit 21-hydroxylázy zachyceného v novorozeneckém screeningu v ČR. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie a výživa*. Praha: Tigis, 2017, **20**(4), 206–210. ISSN 1211-9326.

PAZDÍRKOVÁ, Renata, Jana KOMÁRKOVÁ, Monika HEDELOVÁ a **Jan DAVID**. Inovativní léčba fenylketonurie sapropterinem. *Česko-slovenská Pediatrie*. Praha, 2018, **73**(2), 84–88. ISSN 0069-2328.

DAVID, Jan, Monika HEDELOVÁ a Felix VOTAVA. Falešná pozitivita v novorozeneckém screeningu deficitu 21-hydroxylázy. *Česko-slovenská Pediatrie (v tisku)*.

Kazuistiky s IF:

DAVID, Jan, Kristina RŮCKLOVÁ, Veronika URBANOVÁ a Pavla DOLEŽALOVÁ. Case Report: Unexpected Benefit of Echocardiography in Childhood Polyarteritis Nodosa. *Klinische Pädiatrie* [online]. a-0802-8950. DOI: 10.1055/a-0802-8950. ISSN 0300-8630. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-0802-8950>. **IF 0,698**.

Kazuistiky bez IF:

BROŽOVÁ, Tereza, **Jan DAVID**, Jana KOMRSKOVÁ a Felix VOTAVA. Makro AST jako příčina asymptomatické elevace aspartátaminotransferázy. *Česko-slovenská Pediatrie*. Praha, 2018, **73**(3), 146-148. ISSN 0069-2328.

LHOTSKÁ, Jana, **Jan DAVID**, Felix VOTAVA a Michal KRŠEK. ACTH dependentní Cushingův syndrom. *Česko-slovenská Pediatrie*. Praha, 2018, **73**(2), 90–94. ISSN 0069-2328.

ŠIBÍKOVÁ, Michaela, **Jan DAVID**, Jana LHOTSKÁ a Milan BAYER. Závažný průběh celiakie. *Česko-slovenská Pediatrie (v tisku)*.

ŠIBÍKOVÁ, Michaela, **Jan DAVID**, Jana LHOTSKÁ a Helena JAHNOVÁ. Problematika časně diagnostiky neuroinfekcí. *Česko-slovenská Pediatrie (v tisku)*.

Přednášky

DAVID, Jan a Felix VOTAVA. Narodil se chlapec nebo dívka? II. kongres pediatriů. Praha, 20–21. 10. 2016. Abstract in: *Pediatrie pro praxi*. Praha, 2016, 17(Suppl E).

DAVID, Jan. Kazuistika problému určení pohlaví novorozence. Pediatrické setkání na Královských Vinohradech. Praha, 14. 12. 2016.

VOTAVA, Felix a **Jan DAVID**. Co všechno plodí novorozenecký screening. 18. dny dětské endokrinologie. Pardubice, 27–28. 1. 2017. Abstract in: *Česko-slovenská Pediatrie*. Praha, 2017, **72**(2), 128.

DAVID, Jan a Felix VOTAVA. Narodil se chlapec nebo dívka? 18. dny dětské endokrinologie. Pardubice, 27–28. 1. 2017. Abstract in: *Česko-slovenská Pediatrie*. Praha, 2017, **72**(2), 128–9.

VOTAVA, Felix a **Jan DAVID**. Novorozenecký screening CAH v ČR. 19. dny dětské endokrinologie. Písek, 23–24. 2. 2018.

DAVID, Jan. Polyarteritis nodosa. Pediatrické setkání na Královských Vinohradech. Praha, 19. 12. 2018.

Postery

DAVID, Jan, Hana VINOHRADSKÁ, Petr DEJMEK a Felix VOTAVA. Epidemiologické hodnocení výsledků novorozeneckého screeningu kongenitální adrenální hyperplazie v ČR. XII. Český pediatrický kongres s mezinárodní účastí. Hradec Králové, 15–17. 9. 2016. Abstract in: *Česko-slovenská Pediatrie*. Praha, **71**, Suppl 1: 42–3.

DAVID, Jan, Tereza BROŽOVÁ, Jana KOMRSKOVÁ a Felix VOTAVA. Vzácnější příčina asymptomatické elevace aspartátaminotransferázy. 14. Pediatrická konference. Luhačovice, 20–22. 4. 2018.

VOTAVA, Felix, Viktor KOŽICH, Petr CHRASTINA, Karolína PEŠKOVÁ, Tomáš ADAM, David FRIEDECKÝ, Eva HLÍDKOVÁ, Hana VINOHRADSKÁ, Petr DEJMEK, Veronika KRULIŠOVÁ, Andrea HOLUBOVÁ, Milan MACEK, **Jan DAVID**, Renata GAILLYOVÁ a Ivana VALÁŠKOVÁ. Performance Metrics of 5 Years of Newborn Screening in the Czech Republic. 9th ISNS International Meeting. The Hague, NL, 11–14. 9. 2016. Abstract in: *International Journal of Neonatal Screening*. **2**(3), 69.

VOTAVA, Felix, Petr CHRASTINA, Viktor KOŽICH, Karolína PEŠKOVÁ, Tomáš ADAM, David FRIEDECKÝ, Eva HLÍDKOVÁ, Hana VINOHRADSKÁ, Monika HEDELOVÁ, **Jan DAVID**, Andrea HOLUBOVÁ, Milan MACEK, Veronika SKALICKÁ, Renata GAILLYOVÁ a Ivana VALÁŠKOVÁ. Newborn Screening in the Czech Republic: Results from the last 8 years. 11th ISNS International Meeting. Bratislava, SK, 14–17. 10. 2018. Abstract in: *International Journal of Neonatal Screening*. **4**(28), 26.

Ostatní

Výuka studentů oboru všeobecné lékařství na 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy (předměty Fyziologie, Obecná patofyziologie, Dětské lékařství a Zdravotník zotavovacích akcí).

Výuka studentů oboru výchova ke zdraví na Pedagogické fakultě Univerzity Karlovy (předměty Veřejné zdravotnictví, Vybrané kapitoly z klinických oborů lékařských věd, Základy pediatrie).

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACTH	Adrenokortikotropní hormon
ARG	Argininémie („ <i>Argininemia</i> “)
BH4	Tetrahydrobiopterin
BTD	Deficit biotinidázy („ <i>Biotinidase Deficiency</i> “)
CACTD	Deficit karnitinacylkarnitintranslokázy („ <i>Carnitine-acylcarnitine Translocase Deficiency</i> “)
CAH	Kongenitální adrenální hyperplázie („ <i>Congenital Adrenal Hyperplasia</i> “)
CBSD HCU	Klasická homocystinurie při deficitu cystathionin beta-syntázy („ <i>Homocystinuria from Cystathionine beta-synthase Deficiency</i> “)
CF	Cystická fibróza („ <i>Cystic Fibrosis</i> “)
CFSPID	Nejasná forma cystické fibrózy („ <i>Cystic Fibrosis Screen Positive, Inconclusive Diagnosis</i> “)
CFTR	Chloridový kanál („ <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> “)
CH	Kongenitální hypotyreóza („ <i>Congenital Hypothyroidism</i> “)
CI	Konfidenční interval („ <i>Confidence Interval</i> “)
CIT	Citrulinémie („ <i>Citrulinemia</i> “)
CPTD I	Deficit karnitinpalmitoyltransferázy I („ <i>Carnitine Palmitoyl Transferase I Deficiency</i> “)
CPTD II	Deficit karnitinpalmitoyltransferázy II („ <i>Carnitine Palmitoyl Transferase II Deficiency</i> “)
ČR	Česká republika
ČSÚ	Český statistický úřad
DNA	Deoxyribonukleová kyselina („ <i>Deoxyribonucleic Acid</i> “)

EUNENBS	Evropská síť expertů na novorozenecký screening („ <i>European Network of Experts on Newborn Screening</i> “)
FN	Falešná negativita
FP	Falešná pozitivita
FPR	Frekvence falešné positivity („ <i>False Positivity Rate</i> “)
ft4	Volný tyroxin („ <i>Free Thyroxine</i> “)
GA I	Glutarová acidurie typu I („ <i>Glutaric Acidemia Type I</i> “)
IF	Impakt faktor
IRT	Imunoreaktivní trypsinogen
IVA	Izovaleerová acidurie („ <i>Isovaleric Acidemia</i> “)
KREC	Vyšetření na přítomnost excisních kroužků genové rekombinace segmentů pro imunoglobuliny („ <i>Kappa-deleting Element Excision Circles</i> “)
LCHADD	Deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem („ <i>Long Chain L-3 Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Deficiency</i> “)
LC-MS/MS	Tekutinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrofotometrií („ <i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i> “)
MCADD	Deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem („ <i>Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency</i> “)
MKN	Mezinárodní klasifikace nemocí
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie („ <i>Tandem Mass Spectrometry</i> “)
MSUD	Leucinóza („ <i>Maple Syrup Urine Disease</i> “)
MTHFRD HCU	Homocystinurie při deficitu methylenetetrahydrofolát reduktázy („ <i>Homocystinuria from Methylentetrahydrofolate Reductase Deficiency</i> “)
MZ ČR	Ministerstvo zdravotnictví České republiky

NLS	Novorozenecký laboratorní screening
NPH	Nízká porodní hmotnost (< 2 500 g)
OR	Poměr šancí („ <i>Odds Ratio</i> “)
PAP	Protein asociovaný s pankreatitidou („ <i>Pancreatitis-associated Protein</i> “)
Phe	Fenylalanin („ <i>Phenylalanine</i> “)
PKU/HPA	Fenylketonurie/hyperfenylalaninémie („ <i>Phenylketonuria/Hyperphenylalaninemia</i> “)
PPV	Pozitivní prediktivní hodnota („ <i>Positive Predictive Value</i> “)
RD	Vzácná onemocnění („ <i>Rare Diseases</i> “)
SCID	Těžký kombinovaný imunodeficit („ <i>Severe Combined Immunodeficiency</i> “)
TREC	Vyšetření na přítomnost excisních kroužků genové rekombinace segmentů pro T-buněčné receptory („ <i>T-cell Receptor Excision Circles</i> “)
TSH	Tyreostimulační hormon
ÚZIS ČR	Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky
VLCADD	Deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem („ <i>Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency</i> “)
17OHP	17-hydroxyprogesteron

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ANANDI, Shobi a Bhattacharyya SHAILA. Evaluation of factors associated with elevated newborn 17-hydroxyprogesterone levels. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* [online]. 2017, **30**(6), 677–681 [cit. 2018-07-25]. DOI: 10.1515/jpem-2016-0459. ISSN 2191-0251. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/jpem.2017.30.issue-6/jpem-2016-0459/jpem-2016-0459.xml>

ANANTH, Cande a Anthony VINTZILEOS. Epidemiology of preterm birth and its clinical subtypes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* [online]. 2009, **19**(12), 773–782 [cit. 2018-07-25]. DOI: 10.1080/14767050600965882. ISSN 1476-7058. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14767050600965882>

BARBARO, Michela, Annika OHLSSON, Stephan BORTE, et al. Newborn Screening for Severe Primary Immunodeficiency Diseases in Sweden-a 2-Year Pilot TREC and KREC Screening Study. *Journal of Clinical Immunology* [online]. 2017, **37**(1), 51-60 [cit. 2018-12-13]. DOI: 10.1007/s10875-016-0347-5. ISSN 0271-9142. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10875-016-0347-5>

BARBEN, Jürg, Carlo CASTELLANI, Jeannette DANKERT-ROELSE, et al. The expansion and performance of national newborn screening programmes for cystic fibrosis in Europe. *Journal of Cystic Fibrosis* [online]. 2017, **16**(2), 207-213 [cit. 2018-10-12]. DOI: 10.1016/j.jcf.2016.12.012. ISSN 15691993. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1569199316306816>

BERRY, Susan. Newborn Screening. *Clinics in Perinatology* [online]. 2015, **42**(2), 441–453 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1016/j.clp.2015.03.002. ISSN 00955108. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0095510815000299>

BIJARNIA, Sunita, Bridget WILCKEN a Veronica C. WILEY. Newborn screening for congenital hypothyroidism in very-low-birth-weight babies: the need for a second test. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. 2011, **34**(3), 827–833 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1007/s10545-011-9286-8. ISSN 0141-8955. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10545-011-9286-8>

BLANKENSTEIN, Oliver, M. STOPSACK, R. FINGERHUT, et al. The ISNS 17OHP initiative: Establishing of 17OHP cut-off levels by international collaboration. The 6th European Regional Meeting in Neonatal Screening, Praha, 26.–28.4.2009. Abstrakt in: *Česko-slovenská Pediatrie*. 2009, **64**(4), 192–193 [cit. 2018-07-25].

BLAU, Nenad, Francjan J VAN SPRONSEN a Harvey L LEVY. Phenylketonuria. *The Lancet* [online]. 2010, **376**(9750), 1417-1427 [cit. 2018-12-04]. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60961-0. ISSN 01406736. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673610609610>

BLEHOVÁ, Bohunka, Marie PAŽOUTOVÁ, Dana BLOUDKOVÁ, Olga KROUTILOVÁ. Evaluation of screening for phenylketonuria after 6 years of existence of the laboratory. *Československá Pediatrie*. 1976, **31**, 399–401 [cit. 2018-07-25].

BULLOCH, Marilyn N., Cameron HANNA a Richard GIOVANE. Lumacaftor/ivacaftor, a novel agent for the treatment of cystic fibrosis patients who are homozygous for the F580del CFTR mutation. *Expert Review of Clinical Pharmacology* [online]. 2017, **10**(10), 1055-1072 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1080/17512433.2017.1378094. ISSN 1751-2433. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17512433.2017.1378094>

BURGARD, Peter, Kathrin RUPP, Martin LINDNER, et al. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 2 – From screening laboratory results to treatment, follow-up and quality assurance. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. 2012, **35**(4), 613–625

[cit. 2018-07-25]. DOI: 10.1007/s10545-012-9484-z. ISSN 0141-8955. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10545-012-9484-z>

BÜYÜKGEBİZ, Atilla. Newborn Screening for Congenital Hypothyroidism. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology* [online]. 2012, 4(4) [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.4274/jcrpe.845. ISSN 13085727. Dostupné z: http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_6464/8-12.pdf

CASTELLANI, Carlo, Alistair J.A. DUFF, Scott C. BELL, et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *Journal of Cystic Fibrosis* [online]. 2018, 17(2), 153-178 [cit. 2018-10-12]. DOI: 10.1016/j.jcf.2018.02.006. ISSN 15691993. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1569199318300298>

CAVARZERE, Paolo, Marta CAMILOT, Francesca TEOFOLI a Luciano TATÒ. Neonatal Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia in North-Eastern Italy: A Report Three Years into the Program. *Hormone Research in Paediatrics* [online]. 2005, 63(4), 180–186 [cit. 2018-07-25]. DOI: 10.1159/000085021. ISSN 1663-2818. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/85021>

Consensus Statement on 21-Hydroxylase Deficiency from The Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and The European Society for Paediatric Endocrinology. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2002, 87(9), 4048–4053 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1210/jc.2002-020611. ISSN 0021-972x. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2002-020611>

DALILI, Setila, Seyed Mahmood REZVANY, Arsalan DADASHI, et al. Congenital hypothyroidism: a review of the risk factors. *Acta Med Iran* [online]. 2012, 50(11), 735–739 [cit. 2018-07-25].

DELTETTO, Noelia. Long chain 3-hydroxyacyl-coA dehydrogenase deficiency, association with HELLP and magnetic resonance

spectroscopy findings. *Archivos Argentinos de Pediatría* [online]. 2012, **110**(4), e63–e66 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.5546/aap.2012.e63. ISSN 03250075.

Dostupné z:

<http://www.sap.org.ar/docs/publicaciones/archivosarg/2012/v110n4a10.pdf>

DHILLON, Kuldeep, Thomson HO, Patti RICH, Dadong XU, Fred LOREY, Jianwen SHE a Ajit BHANDAL. An automated method on analysis of blood steroids using liquid chromatography tandem mass spectrometry: Application to population screening for congenital adrenal hyperplasia in newborns. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2011, **412**(23-24), 2076–2084 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1016/j.cca.2011.07.009. ISSN 00098981. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898111004074>

DEN DUNNEN, Johan T., Raymond DALGLEISH, Donna R. MAGLOTT, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Human Mutation* [online]. 2016, **37**(6), 564–569 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1002/humu.22981. ISSN 10597794. Dostupné z:

<http://doi.wiley.com/10.1002/humu.22981>

Doporučení Rady ze dne 8. června 2009 o akci v oblasti vzácných onemocnění. Lucemburk: Evropská unie, 2009, 151/7 [cit. 2018-07-25].

DURYEA, Elaine L., Josiah S. HAWKINS, Donald D. MCINTIRE, Brian M. CASEY a Kenneth J. LEVENO. A Revised Birth Weight Reference for the United States. *Obstetrics & Gynecology* [online]. 2014, **124**(1), 16–22 [cit. 2018-10-11]. DOI: 10.1097/AOG.0000000000000345. ISSN 0029-7844.

Dostupné z:

<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006250-201407000-00005>

FALHAMMAR, Henrik, Anna WEDELL a Anna NORDENSTRÖM. Biochemical and genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine* [online]. 2015, **50**(2), 306–314 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1007/s12020-015-

0731-6. ISSN 1355-008X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12020-015-0731-6>

FESTINI, Filippo, Giovanni TACCETTI, Teresa REPETTO, Maria Francesca REALI, Silvia CAMPANA, Gianfranco MERGNI, Lore MARIANELLI a Maurizio DE MARTINO. Gestational and Neonatal Characteristics of Children with Cystic Fibrosis: A Cohort Study. *The Journal of Pediatrics* [online]. 2005, **147**(3), 316–320 [cit. 2018-07-25]. DOI: 10.1016/j.jpeds.2005.04.031. ISSN 00223476. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347605003409>

FIET, Jean, Yves Le BOUC, Jérôme GUÉCHOT, et al. A Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Profile of 16 Serum Steroids, Including 21-Deoxycortisol and 21-Deoxycorticosterone, for Management of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Journal of the Endocrine Society* [online]. 2017, **1**(3), 186–201 [cit. 2018-11-08]. DOI: 10.1210/js.2016-1048. ISSN 2472-1972. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jes/article/1/3/186/2982827/A-Liquid-ChromatographyTandem-Mass-Spectrometry>

FLORIÁNKOVÁ, Marcela, Šárka BLÁHOVÁ, Magdaléna PENCOVÁ, Tomáš HONZÍK a Pavel JEŠINA. Nutriční terapie u pacientů s dědičnými poruchami metabolismu. *Česko-slovenská Pediatrie*. 2018, **73**(6), 395–407 [cit. 2018-10-09].

FRANKOVÁ, Věra, Felix VOTAVA a Viktor KOŽICH. Etické aspekty rozšiřování novorozeneckého screeningu dědičných metabolických poruch. *Česko-slovenská Pediatrie*. 2014, **69**, 87–94 [cit. 2018-11-19].

GAUDINO, Rossella, Catherine GAREL, Paul CZERNICHOW a Juliane LEGER. Proportion of various types of thyroid disorders among newborns with congenital hypothyroidism and normally located gland: a regional cohort study. *Clinical Endocrinology* [online]. 2005, **62**(4), 444–448 [cit. 2018-10-11]. DOI: 10.1111/j.1365-2265.2005.02239.x. ISSN 0300-0664. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2265.2005.02239.x>

GRUÑEIRO-PAPENDIECK, Laura, Laura PRIETO, Ana CHIESA, Sonia BENGOLEA, Graciela BOSSI a César BERGADÁ. Neonatal Screening Program for Congenital Adrenal Hyperplasia: Adjustments to the Recall Protocol. *Hormone Research in Paediatrics* [online]. 2001, **55**(6), 271–277 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1159/000050012. ISSN 1663-2818. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/50012>

HEATHER, Natasha L., Sumudu N. SENEVIRATNE, Dianne WEBSTER, et al. Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia in New Zealand, 1994–2013. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2015, **100**(3), 1002–1008 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1210/jc.2014-3168. ISSN 0021-972X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2014-3168>

HNÍKOVÁ, Olga, Petr KRAČMAR, Zdeněk ZELENKA, et al. Screening of congenital hypothyroidism in newborns in Bohemia and Moravia. *Endocrinologia Experimentalis*. 1989, **23**(2), 117–23 [cit. 2018-07-25].

HÖPFNER, Stefan, Bernhard HÖPFNER a Ernst W. RAUTERBERG. Neonatal screening for congenital hypothyroidism in Hessen, Germany: efficiency of the screening program and school achievement of 129 children at an age of 8–12 years. *Journal of Perinatal Medicine* [online]. 2005, **33**(6), 543–548 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1515/JPM.2005.097. ISSN 0300-5577. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/view/j/jpme.2005.33.issue-6/jpm.2005.097/jpm.2005.097.xml>

HUET, Frederic, Alice GODEFROY, David CHEILLAN, Chiara SOMMA a Michel ROUSSEY. Do we need congenital adrenal hyperplasia screening for premature infants? *Archives de Pédiatrie* [online]. 2014, **21**(2), 233–236 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1016/j.arcped.2013.11.002. ISSN 0929693X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929693X13005848>

HUGHES, Michelle M., Robert E. BLACK a Joanne KATZ. 2500-g Low Birth Weight Cutoff: History and Implications for Future Research

and Policy. *Maternal and Child Health Journal* [online]. 2017, **21**(2), 283–289 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1007/s10995-016-2131-9. ISSN 1092-7875. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10995-016-2131-9>

CHEONG, Jeanie LY a Lex W DOYLE. Increasing rates of prematurity and epidemiology of late preterm birth. *Journal of Paediatrics and Child Health* [online]. 2012, **48**(9), 784–788 [cit. 2018-07-25]. DOI: 10.1111/j.1440-1754.2012.02536.x. ISSN 10344810. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1754.2012.02536.x>

CHRASTINA, Petr, Josef BÁRTL, Petr HORNÍK, et al. LCHADD – nejčastější příčina poruchy beta oxidace v novorozeneckém screeningu v ČR. *Česko-slovenská Pediatrie*. 2009, **4**, 175–176 [cit. 2018-07-25].

KARALL, Daniela, Michaela BRUNNER-KRAINZ, Katharina KOGELNIG, et al. Clinical outcome, biochemical and therapeutic follow-up in 14 Austrian patients with Long-Chain 3-Hydroxy Acyl CoA Dehydrogenase Deficiency (LCHADD). *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. 2015, **10**(1), 21 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1186/s13023-015-0236-7. ISSN 1750-1172. Dostupné z: <http://www.ajrd.com/content/10/1/21>

KEIL, Stefanie, Karen ANJEMA, Francjan J. VAN SPRONSEN, et al. Long-term Follow-up and Outcome of Phenylketonuria Patients on Sapropterin: A Retrospective Study. *Pediatrics* [online]. 2013, **131**(6), e1881–e1888 [cit. 2018-12-04]. DOI: 10.1542/peds.2012-3291. ISSN 0031-4005. Dostupné z: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2012-3291>

KHARRAZI, Martin, Carlos MILLA a Jeff WINE. Sweat chloride testing: controversies and issues. *The Lancet Respiratory Medicine* [online]. 2016, **4**(8), 605–607 [cit. 2018-10-12]. DOI: 10.1016/S2213-2600(16)30182-5. ISSN 22132600. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213260016301825>

KLIEGMAN, Robert M. et al. *Nelson textbook of pediatrics*. 19th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011. ISBN 9780808924203 [cit. 2018-07-25].

KOLÁŘOVÁ, Hana a Tomáš HONZÍK. Charakteristické klinické příznaky a laboratorní odchylky dědičných poruch metabolismu. *Česko-slovenská Pediatrie*. 2018, **73**(6), 348–364 [cit. 2018-11-19].

KORZENIEWSKI, Steven J., Violanda GRIGORESCU, Mary KLEYN, William I. YOUNG, Gretchen BIRBECK, David TODEM, Roberto ROMERO a Nigel PANETH. Transient Hypothyroidism at 3-Year Follow-Up among Cases of Congenital Hypothyroidism Detected by Newborn Screening. *The Journal of Pediatrics* [online]. 2013, **162**(1), 177–182 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1016/j.jpeds.2012.06.050. ISSN 00223476. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002234761200738X>

KRONE, Nils a Wiebke ARLT. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2009, **23**(2), 181–192 [cit. 2017-10-25]. DOI: 10.1016/j.beem.2008.10.014. ISSN 1521690x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521690X08001449>

KRULIŠOVÁ, Veronika, Miroslava BALAŠČAKOVÁ, Veronika SKALICKÁ, et al. Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA. *European Journal of Pediatrics* [online]. 2012, **171**(8), 1223-1229 [cit. 2018-11-25]. DOI: 10.1007/s00431-012-1747-z. ISSN 0340-6199. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00431-012-1747-z>

KUBÁČKOVÁ, Kateřina. *Vzácná onemocnění: v kostce*. Praha: Mladá fronta, 2014. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3149-3 [cit. 2018-07-25].

KUBÁTOVÁ, Helena. *Rukověť autora diplomky: [čtení a psaní odborných textů ve společenských a humanitních oborech]*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. ISBN 978-80-244-2314-2 [cit. 2018-07-25].

KUKLA, Lubomír. *Sociální a preventivní pediatrie v současném pojetí*. Praha: Grada Publishing, 2016. ISBN 978-80-247-3874-1 [cit. 2018-07-25].

LEBL, Jan, Eva AL TAJI, Stanislava KOLOUŠKOVÁ, Štěpánka PRŮHOVÁ, Marta ŠNAJDEROVÁ a Zdeněk ŠUMNÍK. *Dětská endokrinologie a diabetologie*. Praha: Galén, 2016. ISBN 978-80-7492-271-8 [cit. 2018-07-25].

LEBL, Jan. *Klinická pediatrie*. Praha: Galén, c2012. ISBN 978-80-7262-772-1 [cit. 2018-07-25].

LEBL, Jan. *Malý atlas dětské endokrinologie*. Praha: Galén, c2013. ISBN 978-80-7492-065-3 [cit. 2018-07-25].

LEE, Ji Hoon, Sung Woo KIM, Ga Won JEON a Jong Beom SIN. Thyroid dysfunction in very low birth weight preterm infants. *Korean Journal of Pediatrics* [online]. 2015, **58**(6), 224–229 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.3345/kjp.2015.58.6.224. ISSN 1738-1061. Dostupné z: <http://kjp.or.kr/journal/view.php?doi=10.3345/kjp.2015.58.6.224>

LÉGER, Juliane, Antonella OLIVIERI, Malcolm DONALDSON, Toni TORRESANI, Heiko KRUDE, Guy VAN VLIET, Michel POLAK a Gary BUTLER. European Society for Paediatric Endocrinology Consensus Guidelines on Screening, Diagnosis, and Management of Congenital Hypothyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2014, **99**(2), 363–384 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1210/jc.2013-1891. ISSN 0021-972X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2013-1891>

LEONARD, J.V. a C. DEZATEUX. Newborn screening for medium chain acyl CoA dehydrogenase deficiency. *Archives of Disease in Childhood* [online]. 2009, **94**(3), 235–238 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1136/adc.2007.134957. ISSN 0003-9888. Dostupné z: <http://adc.bmj.com/cgi/doi/10.1136/adc.2007.134957>

LOEBER, J. Gerard, Peter BURGARD, Martina C. CORNEL, Tessel RIGTER, Stephanie S. WEINREICH, Kathrin RUPP, Georg F. HOFFMANN a Luciano VITTOZZI. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 1 - From blood spot to screening result. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. 2012, **35**(4), 603–611 [cit. 2018-07-25]. DOI: 10.1007/s10545-012-9483-0. ISSN 0141-8955. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10545-012-9483-0>

MASSIE, John, Lisette CURNOW, Lydia GAFFNEY, John CARLIN a Ivan FRANCIS. Declining prevalence of cystic fibrosis since the introduction of newborn screening. *Archives of Disease in Childhood* [online]. 2010, **95**(7), 531–533 [cit. 2018-10-11]. DOI: 10.1136/adc.2009.172916. ISSN 0003-9888. Dostupné z: <http://adc.bmj.com/cgi/doi/10.1136/adc.2009.172916>

MAYELL, S.J., A. MUNCK, J.V. CRAIG, I. SERMET, K.G. BROWNLEE, M.J. SCHWARZ, C. CASTELLANI a K.W. SOUTHERN. A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* [online]. 2009, **8**(1), 71–78 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1016/j.jcf.2008.09.005. ISSN 15691993. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1569199308001422>

MCINTIRE, Donald D., Steven L. BLOOM, Brian M. CASEY a Kenneth J. LEVENO. Birth Weight in Relation to Morbidity and Mortality among Newborn Infants. *New England Journal of Medicine* [online]. 1999, **340**(16), 1234–1238 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1056/NEJM199904223401603. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199904223401603>

MEDDA, Emanuela, Antonella OLIVIERI, Maria Antonietta STAZI, et al. Risk factors for congenital hypothyroidism: results of a population case-control study (1997–2003). *European Journal of Endocrinology* [online]. 2005, **153**(6), 765–773 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1530/eje.1.02048. ISSN 0804-4643. Dostupné z: <https://eje.bioscientifica.com/view/journals/eje/153/6/1530765.xml>

Metodický návod k zajištění novorozeneckého laboratorního screeningu a následná péče. Praha: Ministerstvo zdravotnictví České republiky, 2016, číslo 6 [cit. 2018-07-25].

MINUTTI, Carla Z., Jean M. LACEY, Mark J. MAGERA, et al. Steroid Profiling by Tandem Mass Spectrometry Improves the Positive Predictive Value of Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2004, **89**(8), 3687–3693 [cit. 2018-07-25]. DOI: 10.1210/jc.2003-032235. ISSN 0021-972X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2003-032235>

MULLER, A.E., B. THAMM, T. LIETZ, W. HANDRICK a S. WALTER. Cystic fibrosis: a cause of reduced birth weight? *European Journal of Pediatrics*. 1999, **158**, 264 [cit. 2018-07-25].

MYLONA, P., J.D. GLAZIER, S.L. GREENWOOD, M.K. SIDES a C.P. SIBLEY. Expression of the cystic fibrosis (CF) and multidrug resistance (MDR1) genes during development and differentiation in the human placenta. *Molecular Human Reproduction*. 1996, **2**, 693–698 [cit. 2018-07-25].

Národní strategie pro vzácná onemocnění 2010-2020. Praha: Vláda České republiky, 2010, číslo 466 [cit. 2018-07-25].

Novorozenecký screening [online]. [cit. 2018-11-12]. Dostupné z: <https://www.novorozeneckyscreening.cz>

Obyvatelstvo [online]. Český statistický úřad, 2018 [cit. 2018-12-10]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/czech-demographic-handbook>

PARTSCH, Carl J., Wolfgang G. SIPPELL a Hainer MÖNIG. *Endokrinologische Funktionsdiagnostik*. 5., überarb. und erw. Aufl. Kiel: Schmidt und Klaunig, 2005. ISBN 3883121304 [cit. 2018-07-25].

PEŠKOVÁ, Karolina, Petr CHRASTINA, Jan BÁRTL, Tomáš ADAM, Felix VOTAVA, Tomáš HONZÍK a Viktor KOŽICH. Novorozenecký screening

dědičných metabolických poruch v České republice. *Česko-slovenská Pediatrie*. 2018, **73**(6), 390–394 [cit. 2018-11-21].

Prevalence of rare diseases: Bibliographic data. *Orphanet Report Series* [online]. 2018, January 2018 [cit. 2018-10-11]. Dostupné z: https://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_decreasing_prevalence_or_cases.pdf

POURFARZAM, Morteza a Fouzieh ZADHOUSH. Newborn Screening for inherited metabolic disorders; news and views. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2013, **18**, 801–808 [cit. 2018-07-25].

PROCHÁZKA, Bohumír. *Stručná biostatistika pro lékaře*. Praha: Karolinum, 2015. ISBN 9788024627830 [cit. 2018-07-25].

RICHTER, Trevor, Sandra NESTLER-PARR, Robert BABELA, Zeba M. KHAN, Theresa TESORO, Elizabeth MOLSEN a Dyfrig A. HUGHES. Rare Disease Terminology and Definitions—A Systematic Global Review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group. *Value in Health* [online]. 2015, **18**(6), 906–914 [cit. 2018-07-25]. DOI: 10.1016/j.jval.2015.05.008. ISSN 10983015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098301515019798>.

Rodička a novorozenec [online]. Praha: Institut zdravotnických informací a statistiky, 2017 [cit. 2018-10-09].

ROSS, Lainie Friedman a Angus John CLARKE. A Historical and Current Review of Newborn Screening for Neuromuscular Disorders From Around the World: Lessons for the United States. *Pediatric Neurology* [online]. 2017, **77**, 12–22 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2017.08.012. ISSN 08878994. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887899416309651>

SARAFOGLOU, Kyriakie, Georg F. HOFFMAN a Karl S. ROTH. *Pediatric endocrinology and inborn errors of metabolism*. New York: McGraw-Hill, 2008. ISBN 9780071439152 [cit. 2018-07-25].

SILVA, S.A., A.J. CHAGAS, E.M. GOULART, G.A. SILVA, L.V. MARCAL, M.N. GOMES, et al. Screening for congenital hypothyroidism in extreme premature and/or very low birth weight newborns: the importance of a specific protocol. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2010, **23**, 45–52 [cit. 2018-07-25].

SLAUGHTER, Jonathan L., Jareen MEINZEN-DERR, Susan R. ROSE, Nancy D. LESLIE, Ram CHANDRASEKAR, Sharon M. LINARD a Henry T. AKINBI. The Effects of Gestational Age and Birth Weight on False-Positive Newborn-Screening Rates. *Pediatrics* [online]. 2010, **126**(5), 910–916 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1542/peds.2010-0943. ISSN 0031-4005. Dostupné z: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2010-094>

SOMMERBURG, Olaf, Veronika KRULISOVA, Jutta HAMMERMANN, et al. Comparison of different IRT-PAP protocols to screen newborns for cystic fibrosis in three central European populations. *Journal of Cystic Fibrosis* [online]. 2014, **13**(1), 15–23 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1016/j.jcf.2013.06.003. ISSN 15691993. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1569199313001082>

SPEISER, Phyllis W., Ricardo AZZIZ, Laurence S. BASKIN, et al. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2010, **95**(9), 4133–4160 [cit. 2018-07-25]. DOI: 10.1210/jc.2009-2631. ISSN 0021-972X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2009-2631>

SPERLING, Mark. *Pediatric endocrinology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 2002. ISBN 9780721695396 [cit. 2018-07-25].

STEIGERT, Michael, Eugen J. SCHOENLE, Anna BIASON-LAUBER a Toni TORRESANI. High Reliability of Neonatal Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia in Switzerland. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2002, **87**(9), 4106–4110 [cit. 2018-07-25]. DOI:

10.1210/jc.2002-012093. ISSN 0021-972X. Dostupné z:

<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2002-012093>

STRAUSS, Arnold W., Michael J. BENNET, Piero RINALDO, Harold F. SIMS, Laurie K. O'BRIEN, Yiwen ZHAO, et al. Inherited long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency and a fetal-maternal interaction cause maternal liver disease and other pregnancy complications. *Seminars in Perinatology*. 1999, **23**, 100–112 [cit. 2018-07-25].

SVATOŇ, Michael, Anna ŠEDIVÁ, Ester MEJSTRÍKOVÁ, et al. Differential diagnostics of immunodeficiency using antigen receptor excision circles in neonatal screening cards and in postnatal peripheral blood. The 8th European Regional Meeting of International Society of Neonatal Screening, Hungary, Budapest. *Orvosi Hetilap* 2012, 42 [cit. 2018-07-25].

SVEGER, Tomas a Tomas THELIN. A future for neonatal alpha-1 antitrypsin screening? *Acta Paediatrica*. 2000, **89**(3), 259–261 [cit. 2018-11-21].

The portal for rare diseases and orphan drugs [online]. [cit. 2018-10-11].

Dostupné z: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN

THERRELL, Bradford L., Carmencita David PADILLA, J. Gerard LOEBER, Issam KNEISSER, Amal SAADALLAH, Gustavo J.C. BORRAJO a John ADAMS. Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Seminars in Perinatology* [online]. 2015, **39**(3), 171–187 [cit. 2018-07-25]. DOI: 10.1053/j.semperi.2015.03.002. ISSN 01460005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146000515000191>

TORRESANI, Toni, Anna GRÜTERS, Rudolf SCHERZ, et al. Improving the efficacy of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by adjusting the cut-off level of 17 α -hydroxyprogesterone to gestational age. *Screening* [online]. 1994, **3**(2), 77–84 [cit. 2018-07-25]. DOI: 10.1016/0925-6164(94)90003-5. ISSN 09256164. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0925616494900035>

TRAPP, Christine M. a Sharon E. OBERFIELD. Recommendations for treatment of nonclassic congenital adrenal hyperplasia (NCCAH): An update. *Steroids* [online]. 2012, **77**(4), 342–346 [cit. 2017-06-26]. DOI: 10.1016/j.steroids.2011.12.009. ISSN 0039128x.

TSUJI, Atsumi, Kaoru KONISHI, Satomi HASEGAWA, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Tokyo, Japan from 1989 to 2013: a retrospective population-based study. *BMC Pediatrics* [online]. 2015, **15**(1), 209 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1186/s12887-015-0529-y. ISSN 1471-2431. Dostupné z: <http://bmcpediatr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12887-015-0529-y>

TYLEK-LEMAŃSKA, Dorota, Małgorzata KUMOROWICZ-KOPIEC a Jerzy STARZYK. Screening for congenital hypothyroidism: the value of retesting after four weeks in neonates with low and very low birth weight. *Journal of Medical Screening* [online]. 2016, **12**(4), 166–169 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1258/096914105775220697. ISSN 0969-1413. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1258/096914105775220697>

VAIDYA, Bijay, Viv CAMPBELL, John H. TRIPP, Gill SPYER, Andrew T. HATTERSLEY a Sian ELLARD. Premature birth and low birth weight associated with nonautoimmune hyperthyroidism due to an activating thyrotropin receptor gene mutation. *Clinical Endocrinology* [online]. 2004, **60**(6), 711–718 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1111/j.1365-2265.2004.02040.x. ISSN 0300-0664. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2265.2004.02040.x>

VAN DER KAMP, Hetty J., Caren G. M. OUDSHOORN, Bert H. ELVERS, Maja VAN BAARLE, Barto J. OTTEN, Jan M. WIT a Paul H. VERKERK. Cutoff Levels of 17- α -Hydroxyprogesterone in Neonatal Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia Should Be Based on Gestational Age Rather Than on Birth Weight. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2005, **90**(7), 3904–3907 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1210/jc.2004-2136. ISSN 0021-972X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2004-2136>

VAN SPRONSEN, Francjan J, Annemiek MJ VAN WEGBERG, Kirsten AHRING, et al. Key European guidelines for the diagnosis and management of patients with phenylketonuria. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* [online]. 2017, **5**(9), 743–756 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1016/S2213-8587(16)30320-5. ISSN 22138587. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213858716303205>

VÁVROVÁ, Věra, Dana ZEMKOVÁ, Veronika SKALICKÁ a Felix VOTAVA. Problémy v diagnostice cystické fibrózy – potřeba novorozeneckého screening. *Česko-slovenská Pediatrie*. 2006, **61**, 703–709 [cit. 2018-07-25].

VOTAVA, Felix, Viktor KOŽICH, Petr CHRASTINA, et al. Výsledky rozšířeného novorozeneckého screeningu v České republice. *Česko-slovenská Pediatrie*. 2014, **69**, 77–86 [cit. 2018-07-25].

VOTAVA, Felix, Viktor KOŽICH, Petr CHRASTINA, et al. Performance metrics of 5 years of newborn screening in the Czech Republic. *International Journal of Neonatal Screening*. 2016, **2**, 69–70 [cit. 2018-07-25].

VOTAVA, Felix, Dana NOVOTNÁ, Petr KRAČMAR, et al. Lessons learned from 5 years of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in the Czech Republic: 17-hydroxyprogesterone, genotypes, and screening performance. *European Journal of Pediatrics* [online]. 2012, **171**(6), 935–940 [cit. 2017-10-25]. DOI: 10.1007/s00431-011-1656-6. ISSN 0340-6199. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00431-011-1656-6>

Vzácná onemocnění [online]. [cit. 2018-11-21]. Dostupné z: <https://www.vzacna-onemocneni.cz>

WALLER, Kim, James ANDERSON, Fred LOREY a George CUNNINGHAM. Risk factors for congenital hypothyroidism: an investigation of infant's birth weight, ethnicity, and gender in California, 1990–1998. *Teratology* [online]. 2000, **62**, 36–41 [cit. 2018-07-25].

WEDELL, Anna. Molecular Genetics of 21- Hydroxylase Deficiency. GHIZZONI, L., M. CAPPA, G.P. CHROUSOS, S. LOCHE a M. MAGHNIE, ed. *Pediatric Adrenal Diseases* [online]. S. Karger, 2010, **20**, 80–87 [cit. 2018-10-11]. *Endocrine Development*. DOI: 10.1159/000321223. ISBN 978-3-8055-9643-5. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/321223>

WILSON, James Maxwell a Gunnar JUNGNER. Principles and practise of mass screening for disease. *Bol Of Sanit Panam*. 1968, **65**(4), 281–393 [cit. 2018-07-25].

Zákon č. 373/2011 Sb., o specifických zdravotních službách. In: *Sbírka zákonů*. 1. 6. 2018 [cit. 2018-12-18].

Zdraví 2020: národní strategie ochrany a podpory zdraví a prevence nemocí. Praha: Ministerstvo zdravotnictví České republiky ve spolupráci se Státním zdravotním ústavem, 2014. ISBN 978-80-85047-47-9 [cit. 2018-07-25].

ZVÁRA, Karel. *Biostatistika*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 9788024607399 [cit. 2018-11-20].

ZVÁROVÁ, Jana. *Základy statistiky pro biomedicínské obory*. 2., dopl. vyd. Praha: Karolinum, 2011. Biomedicínská statistika. ISBN 978-80-246-1931-6 [cit. 2018-11-20].

SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

- Tab. 1 Obecné principy screeningového programu
- Tab. 2 Přehled nejčastějších vzácných onemocnění dětského věku
- Tab. 3 Nemoci vyhledávané novorozeneckým laboratorním screeningem v České republice v roce 2018
- Tab. 4 „Cutoff“ hodnoty pro jednotlivé dědičné metabolické poruchy
- Tab. 5 Konfirmační kritéria screenovaných poruch metabolismu
- Tab. 6 Vztah fenotypu a aktivity 21-hydroxylázy
- Tab. 7 Přehled centrálních screeningových laboratoří v České republice
- Tab. 8 Výsledky novorozeneckého screeningu v České republice v letech 2010–2017
- Tab. 9 Přehled známých falešně negativních nálezů v novorozeneckém laboratorním screeningu cystické fibrózy v období 2010–2017
- Tab. 10 Statistické vyhodnocení rozdílu prevalence u novorozenců s normální a nízkou porodní hmotností (období 2002–2016)
- Tab. 11 Zachycení a potvrzení novorozenci ve screeningu deficitu 21-hydroxylázy v období 2015–2017
- Tab. 12 Statické vyhodnocení významnosti rozdílu frekvencí falešné pozitivivity v jednotlivých letech v období 2015–2017
- Tab. 13 Přehled pacientů s deficitem 21-hydroxylázy, které novorozenecký screening v období 2006–2017 nedetekoval
- Tab. 14 Interpretace screeningových hodnot 17-hydroxyprogesteronu
- Tab. 15 Vztah fenotypu a genotypu *CYP21A2* u deficitu 21-hydroxylázy
- Obr. 1 Vztahy jednotlivých pojmů, které charakterizují novorozenecký laboratorní screening
- Obr. 2 Schéma diagnostického protokolu novorozeneckého screeningu cystické fibrózy v České republice

Obr. 3 Zjednodušený algoritmus konfirmační diagnostiky u pacienta zachyceného v novorozeneckém laboratorním screeningu deficitu 21-hydroxylázy

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1. DAVID, Jan, Petr CHRASTINA, Karolina PEŠKOVÁ, Viktor KOŽICH, David FRIEDECKÝ, Tomáš ADAM, Eva HLÍDKOVÁ, Hana VINOHRADSKÁ, Dana NOVOTNÁ, Monika HEDELOVÁ, Eva AL TAJI, Andrea HOLUBOVÁ, Veronika SKALICKÁ, Milan MACEK, Renata GAILLYOVÁ a Felix VOTAVA. Epidemiology of Rare Diseases Detected by Newborn Screening in the Czech Republic. *Central European Journal of Public Health*.

Příloha 2. DAVID, Jan, Petr CHRASTINA, Hana VINOHRADSKÁ, Eva AL TAJI, Andrea HOLUBOVÁ, Eva HLÍDKOVÁ, Viktor KOŽICH a Felix VOTAVA. Neonatal Screening in the Czech Republic: Increased Prevalence of Selected Diseases in Low Birthweight Neonates. *European Journal of Pediatrics*.

Příloha 3. DAVID, Jan, Monika HEDELOVÁ a Felix VOTAVA. Falešná pozitivita v novorozeneckém screeningu deficitu 21-hydroxylázy. *Česko-slovenská Pediatrie*.

Příloha 4. DAVID, Jan a Felix VOTAVA. Postup u pacienta s podezřením na deficit 21-hydroxylázy zachyceného v novorozeneckém screeningu v ČR. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie a výživa*

Epidemiology of rare diseases detected by newborn screening in the Czech Republic

Jan David¹, Petr Chrastina², Karolina Pešková², Viktor Kožich², David Friedecký³, Tomáš Adam³, Eva Hlídková³, Hana Vinohradská⁴, Dana Novotná⁵, Monika Hedelová¹, Eva Al Taji¹, Andrea Holubová⁶, Veronika Skalická⁷, Milan Macek⁶, Renata Gaillyová⁸, Felix Votava¹

¹ Department of Children and Adolescents, 3rd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic

² Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic

³ Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacky University and University Hospital Olomouc, Czech Republic

⁴ Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno, Czech Republic

⁵ Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno, Czech Republic

⁶ Department of Biology and Medical Genetics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

⁷ Department of Pediatrics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

⁸ Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno, Czech Republic

Corresponding author: Assoc. prof. MUDr. Felix Votava, Ph.D., felix.votava@fnkv.cz Department of Children and Adolescents, Third Faculty of Medicine, Charles University, University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic, Srobarova 1150/50, Prague 10, 100 34

Keywords: rare disease, newborn screening, Czech Republic, public health, epidemiology, prevention

Summary

Objectives: Presymptomatic detection of patients with rare diseases (RD, defined by a population frequency less than 1:2,000) is the task of newborn screening (NBS). In the Czech Republic (CZ) currently eighteen RD are screened: phenylketonuria/hyperphenylalaninemia (PKU/HPA), congenital hypothyroidism (CH), congenital adrenal hyperplasia (CAH), cystic fibrosis (CF), medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD), long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD), very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (VLCADD), carnitine palmitoyl transferase I and II deficiency (CPTID, CPTIID), carnitine-acylcarnitine translocase deficiency (CACTD), maple syrup urine disease (MSUD), glutaric aciduria, type I (GA I), isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency (IVA), argininemia (ARG), citrullinemia (CIT), biotinidase deficiency (BTD), cystathionine beta-synthase-deficient homocystinuria (CBSD HCU), and methylenetetrahydrofolate reductase deficiency homocystinuria (MTHFRD HCU). The aim was to analyze the prevalence of RD screened by the NBS in CZ.

Methods: We examined the NBS program in the CZ from Jan 1, 2010–Dec 31, 2017, which covered 888,891 neonates. Dried blood spots were primarily analyzed using fluorescence *immuno*-assay, tandem mass spectrometry and fluorimetry.

Results: The overall prevalence of RD among the neonate cohort was 1:1,043. Individually, 1:2,877 for CH, 1:5,521 for PKU/HPA, 1:6,536 for CF (1:5,887 including false negative patients), 1:12,520 for CAH, 1:22,222 for MCADD, 1:80,808 for LCHADD, 1:177,778 for GA I, 1:177,778 for IVA, 1:222,223 for VLCADD, 1:296,297 for MSUD, 1:8,638 for BTD and 1:181,396 for CBSD HCU.

Conclusions: The observed prevalence of RD, based on NBS, corresponds to that expected, more precisely it was higher for BTD and lower for MSUD, IVA, CBSD HCU, MCADD and VLCADD. Early detection of rare diseases by means of NBS is an effective secondary prevention tool.

Introduction

Rare diseases (RD) are defined by a population frequency less than 1:2,000 and represent a heterogeneous group of up to 8,000 disorders [1]. Despite significant therapeutic advances in the treatment of RD, many patients still suffer from insufficient diagnostics and inadequate care. With a view toward standardizing and harmonizing evidence-based health practices in the European Union, the Committee of Experts on RD (EUROCARD, www.eucerd.eu) was established in 2010 [2]. The Government of the Czech Republic (CZ), through Resolution No. 466 of 14 June 2010, endorsed the "National Strategy for Rare Diseases for the Years 2010-2020" [3], which summarizes the issue of rare diseases from both the European Union and CZ viewpoints and proposes a core set of objectives and measures to improve RD diagnosis and treatment in the CZ. This Resolution includes newborn screening (NBS) as an important area since all diseases included in NBS are classified as RD and NBS represents a model approach to RD diagnosis and treatment.

NBS is an effective secondary prevention tool [4], for active population-wide detection of congenital and/or inherited diseases or defects in the early preclinical stages [5]. The greater the number of neonates in a region that are screened, the greater the effectiveness of the NBS system. NBS is based on specific substances concentration measurement in dried blood spots (DBS) on filter paper and in selected probands on pathogenic allelic variants analysis in the same DBS. The overall NBS system is comprised of a reliable pre-analytical process (standardization of sample collection, timing, repeated samples, etc.), an analytical process (selection of laboratory methods, storage and utilization of samples), and a post-analytical process (protocols or procedures used in positive or unclear findings) [6]. The rules of all these activities are summarized in the Methodological Guidelines Manual of the Czech Ministry of Health, which defines the medical "Lege Artis" procedures in the NBS including methods of diagnostic confirmation and subsequent care of patients detected by NBS [7].

NBS was first implemented in the CZ in 1975, for phenylketonuria/hyperphenylalaninemia (PKU/HPA) [8]. NBS was then expanded: in 1985 for congenital hypothyroidism (CH) [9], in 2006 for 21-hydroxylase deficiency (congenital adrenal hyperplasia, CAH) [10], in 2009 for cystic fibrosis (CF) [11], and nine other inherited metabolic disorders (IMD) (i.e., medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD), long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD), very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (VLCADD), carnitine palmitoyl transferase I and II deficiency (CPTID, CPTIID), carnitine-acylcarnitine translocase deficiency (CACTD), maple syrup urine disease (MSUD), glutaric aciduria, type I (GA I), and isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency (IVA) [12]). The latest expansion was made in June 2016, when five additional IMD were added, (i.e., argininemia (ARG), citrullinemia (CIT), biotinidase deficiency (BTD), cystathionine beta-synthase-deficient homocystinuria (CBSD HCU) and methylenetetrahydrofolate reductase deficiency homocystinuria (MTHFRD HCU)).

The aim of this study was to analyze the epidemiology of RD screened by NBS in the CZ between years 2010 and 2017.

Material and Methods

The study (Jan 1, 2010–Dec 31, 2017) was based on results derived from DBS on filter paper that were collected from the heel pricks and sent to specified laboratories (Table 1) by mail. DBS were taken between the 48th–72th hour of newborn life. Our epidemiological data show the prevalence of screened RD at the time of DBS sampling.

The analysis included 888,891 neonates, which covers 100% of the Czech neonatal population (2010–2017). Data were obtained from newborn screening laboratories (Table 1). DBS were tested for:

- (1) thyroid-stimulating hormone (TSH), using fluorescence *immuno*-assay (FIA; Delfia a AutoDelfia produced by Perkin-Elmer) for detection of CH [13];
- (2) 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) for detection of CAH using the abovementioned method [10];
- (3) immunoreactive trypsinogen (IRT) for detection of CF using FIA, and from the group with the highest IRT levels, a subsequent DNA analysis of the *CFTR* (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) gene was performed (initially 32 and from July 2010 50 common variants were tested using the commercial Elucigene assays produced by Elucigene Diagnostics) using the original DBS [11];

(4) amino acids and acylcarnitines for detection of IMD were determined using tandem mass spectrometry (MS/MS) using kits (MassChrom Reagent produced by Chromsystems) and MS/MS instrumentation (API 2000TM, API 3200TM and API 4000TM produced by AB Sciex), namely PKU/HPA, MCADD, LCHADD, VLCADD, CPTID, CPTIID, CACTD, MSUD, GA I, IVA, ARG, CIT, BT, CBS HCU and MTHFR HCU [14]. Patients with BT were detected using fluorimetry.

Newborns with positive NBS findings were referred for follow-up to appropriate clinical centres to confirm the diagnosis using generally accepted diagnostic standards: in cases with a confirmed diagnosis patients started subsequent care [7]. Decision limits for the screened disorders are summarized in Table 2 and confirmatory test criteria in Table 3 [15–19]. The numbers of confirmed diagnoses from NBS were based on feedback reports from clinical care centres. In cases with unclear results (i.e., between negative and positive decision limits), disease specific protocols were applied (mostly repeated DBS sampling). The percentage of number of newborns with a final negative result was presented as the false positivity rate (FPR). FPR was calculated as the ratio between the number of false positives and the total number of negatives findings. Positive predictive value (PPV) stated the probability that newborns with a positive screening test truly had the disease (the percentage of patients with a positive test who actually had the disease). PPV was calculated as the ratio between the number of true positives and the number of true positives and false positives findings).

Results

Table 4 shows results of NBS in the CZ from 2010–2017.

Discussion

Terminologically accurate we have quantified prevalence at the age of DBS sampling. Considering that screened RD are inherited conditions and thanks to NBS can be treated in a timely manner, and based on a normal life expectancy during childhood, it can be assumed that the prevalence of RD is almost the same as their frequency and incidence in the general pediatric population. Table 5 summarizes the data from the literature of other countries relative to the prevalence of RD screened in the CZ [18,20–22]. A comparison with our results leads us to conclude that the prevalence in Czech population is higher for BT, but lower for MSUD, IVA, CBS HCU, MCADD and VLCADD. However, in the case of low prevalence, the statistical effect of small numbers may occur.

One interesting result was the markedly lower population frequency of CF than reported previously, i.e., 1:2,700 based on clinical observations in the CZ [23]. The explanation for this difference likely rests with the increasing effect of prenatal diagnosis and better-informed reproductive decisions [22].

The cause of false negativity in CF NBS is predominantly due to lower IRT levels in CF newborns with meconium ileus (six cases from 15 false negative patients). While these infants can be detected clinically, there are nevertheless, a small number of CF newborns that escape detection due to very rare mutations on both alleles.

The improving efficacy of NBS to detect RD in the CZ was also documented by the increasing cumulative screening prevalence with the stepwise expansion of screened disorders from 1:2,701 between 2002–2005 to 1:2,072 in 2007–2008 [24], to 1:1,043 in the currently evaluated period (2010–2017). In a comparison of the number of screened disorders in Europe [25], the CZ ranks better than average. On the other hand, the achieved high NBS detection levels were associated with an increasing frequency of repeated DBS, with the current cumulative FPR 0.64 %. FPR impacts the healthy population and can stigmatize neonates and their families [26]. Reducing the FPR is a challenge and one of the objectives of the NBS system. From our results, CAH has the highest FPR, with other screened disorders having significantly lower FPR. An effective way to reduce FPR is by implementation of a secondary analytic tier based on the original DBS: in the case of CAH for example, using liquid chromatography with MS/MS [27]. Pilot studies looking for ways to address this issue are in progress abroad and in the CZ.

The greater number of diseases screened by the NBS system corresponds with technological progress and analytic potential. However, expanding the NBS system can create problems, not only technical, but also ethic, economic, legislative, and political ones. Current Czech legislation does not allow the nationwide NBS, which would be primarily based on genome analysis, e.g., NBS for spinal muscular atrophy, although it would be effective for early diagnosis and therapy [28].

The above-mentioned issues have led to discussions about adding or refining the original criteria of the NBS system, defined in 1968 by Wilson and Jungner [5]. Every NBS expansion is associated with questions about the selection criteria. Traditional screening criteria can function as guidelines even if their universal applicability has been questioned by new biotechnologies and scientific progress. Before adding a new disorder to the screening panel, it is necessary to evaluate the balance between health benefits and potential harms [26]. In 2010–2011, the European Network of Experts on Newborn Screening (EUNENBS) created a questionnaire study and published a list of 26 diseases, which could be included in European NBS system [29]. The list is divided into basic groups with higher and lower prevalence and candidate groups (Table 6). In the CZ, the study of NBS of severe combined immunodeficiency (SCID) has already been methodologically prepared [30].

Conclusions

The prevalence of screened RD in the Czech population mostly corresponds with internationally published data, actually it was found higher for BTD and lower for MSUD, IVA, CBSH HCU, MCADD and VLCADD.

NBS in the CZ detects patients with RD in the early preclinical stages and the level of NBS corresponds with the standard used by many states of the European Union. NBS in the CZ represents an efficient tool to improve the quality of care for patients with RD. The next important steps in NBS optimization will be to (1) examine additional analytical methods to reduce false positivity, (2) consider expanding the list of screened disorders and (3) discuss decision limits which can detect milder forms, e.g. in CH.

Acknowledgements

Institutional support was provided by the project DRO VFN64165 from the Ministry of Health of the Czech Republic, and by projects Progres Q26 and Q36 from Charles University.

Statement of Conflict of Interests

The authors have no conflicts of interest relevant to this article.

Table 1: Newborn screening laboratories in the Czech Republic

Imunoanalytic methods	Tandem mass spectrometry, fluorimetry	DNA analysis
Department of Children and Adolescents, University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague	Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, General University Hospital, Prague	Department of Biology and Medical Genetics, University Hospital Motol, Prague
Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Brno	Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Olomouc	Department of Medical Genetics, University Hospital Brno

Table 2: Decision (positivity) limits for analytes detected in dried blood spots (decision limits for amino acids and acylcarnitines in parentheses are for non-derivatized assays)

Disorder	Analyte	Decision limit (capillary blood)
Congenital hypothyroidism	Thyroid-stimulating hormone (TSH)	TSH \geq 15.0 mIU/L
Cystic fibrosis	Immunoreactive trypsinogen (IRT) and <i>CFTR</i> (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) gene mutations	IRT > 99.0 percentile (65.0 ng/mL) and <i>CFTR</i> mutation on at least one allele or without mutation and IRT \geq 200 ng/mL
Congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency)	17-hydroxyprogesterone (17-OHP)	17-OHP according to birthweight/gestational age, range 20.0-160 nmol/L, example: 20.0 nmol/l for \geq 2700 g (\geq 37 gestational week)
Phenylketonuria/hyperphenylalaninemia	Phenylalanine (Phe) Tyrosine (Tyr)	Phe > 120 μ mol/L and Phe/Tyr ratio > 2.00
Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	Octanoylcarnitine (C8) Acetylcarnitine (C2)	C8 > 0.40 (0.50) μ mol/L and C8/C2 ratio > 0.02 (0.03) μ mol/L
Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency	Hydroxypalmitoylcarnitine (C16OH) Hydroxyoleoylcarnitine (C18:1OH)	C16OH > 0.10 μ mol/L or C18:1OH > 0.10 (0.07) μ mol/L
Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	Tetradecenoylcarnitine (C14:1) Acetylcarnitine (C2) Palmitoylcarnitine (C16)	C14:1 > 0.55 (0.40) μ mol/L and C14:1/C2 ratio > 0.03 and C14:1/C16 ratio > 0.26 (0.15)
Carnitine palmitoyl transferase I deficiency	Free carnitine (C0) Palmitoylcarnitine (C16) Oleoylcarnitine (C18:1) Acetylcarnitine (C2)	C0 > 60.3 (57.0) μ mol/L and C0/(C16+C18) ratio > 25.0 (29.0) and (C16+C18:1)/C2 ratio < 0.10
Carnitine palmitoyl transferase II deficiency Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency	Palmitoylcarnitine (C16) Oleoylcarnitine (C18:1) Acetylcarnitine (C2)	C16 > 5.06 (7.00) μ mol/L and (C16+C18:1)/C2 ratio > 0.35 (0.48)
Glutaric aciduria type I	Glutarylcarnitine (G5DC) Octanoylcarnitine (C8) Palmitoylcarnitine (C16)	C5DC > 0.40 (0.60) μ mol/L and C5DC/C8 ratio > 5.40 (C5DC/C16 > 0.40)
Maple syrup urine disease	Leucine (Leu) Isoleucine (Isoleu) Hydroxyproline (Hyp) Alanine (Ala) Valine (Val) Tyrosine (Tyr) Phenylalanine (Phe)	Leu + Isoleu + Hyp > 270 μ mol/L (Leu > 260 μ mol/L) and Leu/Ala ratio > 1.40 (1.25) or Leu + Val/Phe + Tyr > 3.79
Isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency	Isovalerylmethylbutyrylcarnitine (C5) Free carnitine (C0) Propionylcarnitine (C3) Octanoylcarnitine (C8)	C5 > 1.00 (0.60) μ mol/L and C5/C0 ratio > 0.03 and C5/C3 ratio > 0.39 (C5/C8 ratio > 20.0)
Citrullinemia	Citrulline (Cit) Ornithine (Orn) Phe (Phenylalanine)	Cit > 70.0 (56.0) μ mol/L and Orn/Cit ratio < 2.09 (2.51) and Cit/Phe ratio > 0.95 (0.81)
Biotinidase deficiency	Biotinidase serum activity	Biotinidase serum activity < 30.0% than median of health population
Cystathionine beta-synthase-deficient homocystinuria	Methionine (Met) Phenylalanine (Phe) Homocystein (Hcys)	Met > 33.0 (36.4) μ mol/L and Met/Phe ratio > 0.58 (0.41) and Hcys > 12.0 (15.0) μ mol/L
Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency homocystinuria	Methionine (Met) Phenylalanine (Phe) Homocystein (Hcys)	Met < 7.00 μ mol/L or Met/Phe ratio < 0.15 (0.10) and Hcys > 12.00 (15.0) μ mol/L
Argininemia	Arginine (Arg) Ornithine (Orn) Phenylalanine (Phe)	Arg > 60.0 (63.0) μ mol/l and Arg/Orn ratio > 0.75 (0.40) and Arg/Phe ratio > 1.02 (0.98)

Table 3: Confirmatory test criteria for screened disorders

Disorder	Definition (venous blood sample)
Congenital hypothyroidism	Thyroid-stimulating hormone (TSH) > 8.00 mIU/L or free thyroxine (fT4) < 12.0 pmol/L
Cystic fibrosis	Sweat test \geq 60.0 mmol/L or 30.0 – 59.0 mmol/L and two pathogenic mutations in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (<i>CFTR</i>) gene
Congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency)	Basal level of 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) above reference range and/or positive cosyntropin test and casual mutation in <i>CYP21A2</i> gene
Phenylketonuria/hyperphenylalaninemia	Phenylalanine (Phe) > 120 μ mol/L
Medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency	Octanoylcarnitine (C8) and acetylcarnitine (C2) above reference range, and MCAD deficiency or two pathogenic mutations in <i>ACADM</i> gene or decreased fatty acid oxidation (FAO) in lymphocytes
Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) deficiency	Hydroxypalmitoylcarnitine (C16OH) and hydroxyoleoylcarnitine (C18:1OH) above reference range, and LCHAD deficiency or two pathogenic mutations in <i>HADHA</i> gene or positive BOX in lymphocytes
Very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency	Tetradecenoylcarnitine (C14:1) and acylcarnitine (C2) and palmitoylcarnitine (C16) above reference range and VLCAD deficiency or two pathogenic mutations in <i>ACADVL</i> gene or decreased FAO in lymphocytes
Carnitine palmitoyl transferase (CPT) I deficiency	Free carnitine (C0) and palmitoylcarnitine (C16) and oleoylcarnitine (C18:1) and acetylcarnitine (C2) above reference range and CPT I deficiency or two pathogenic mutations in <i>CPT1A</i> gene or decreased FAO in lymphocytes
Carnitine palmitoyl transferase (CPT) II deficiency	Palmitoylcarnitine (C16) and oleoylcarnitine (C18:1) and acetylcarnitine (C2) above reference range, and CPT II deficiency or two pathogenic mutations in <i>CPT2</i> gene
Carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) deficiency	Palmitoylcarnitine (C16) and oleoylcarnitine (C18:1) and acetylcarnitine (C2) above reference range and CACT deficiency or two pathogenic mutations in <i>SLC25A20</i> gene
Glutaric aciduria type I	Glutarylcarnitine (C5DC) and octanoylcarnitine (C8) and palmitoylcarnitine (C16) above reference range and glutaryl CoA dehydrogenase deficiency or two pathogenic mutations in <i>GCD</i> gene
Maple syrup urine disease	Leucine (Leu) and isoleucine (Isoleu) and hydroxyproline and alanine (Ala) and valine (Val) and tyrosine (Tyr) and phenylalanine (Phe) above reference range and branched-chain ketoacid dehydrogenase (BCKAD) deficiency or two pathogenic mutations in <i>BCKDHA</i> gene or <i>BCKDHB</i> gene or <i>DBT</i> gene
Isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency	Isovalerylmethylbutyrylcarnitine (C5) and free carnitine (C0) and propionylcarnitine (C3) and octanoylcarnitine (C8) above reference range and isovaleryl CoA dehydrogenase deficiency or two pathogenic mutations in <i>IVD</i> gene
Citrullinemia	Argininosuccinate synthase deficiency or two pathogenic mutations in <i>ASS1</i> gene
Biotinidase deficiency	Biotinidase deficiency or two pathogenic mutations in <i>BTD</i> gene
Cystathionine beta-synthase-deficient homocystinuria	Cystathionine beta-synthase deficiency or two pathogenic mutations in <i>CBS</i> gene
Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency homocystinuria	Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency or two pathogenic mutations in <i>MTHFR</i> gene
Argininemia	Arginase deficiency or two pathogenic mutations in <i>ARG1</i> gene

Table 4: Results of newborn screening in the Czech Republic from 2010–2017

Disease	Period	Number of screened neonates (n)	Number of confirmed diagnosis (n)	Screening prevalence	Number of FP (n)	FPR total (%)	PPV		
PKU/HPA	Jan 1, 2010– Dec 31, 2017	888,891	161	1:5,521	238	0.0268	0.40		
CH			309	1:2,877	197	0.0222	0.61		
CAH			71	1:12,520	3696	0.4158	0.02		
CF			136	1:6,536	967	0.1088	0.12		
MCADD			40	1:22,222	17	0.0019	0.70		
LCHADD			11	1:80,808	4	0.0004	0.73		
VLCADD			4	1:222,223	62	0.0070	0.06		
CPTID			0	-	29	0.0033	-		
CPTIID/CACTD			0	-	2	0.0002	-		
MSUD			3	1:296,297	90	0.0101	0.03		
GA I			5	1:177,778	29	0.0033	0.15		
IVA			5	1:177,778	75	0.0084	0.06		
ARG			Jun 1, 2016– Dec 31, 2017	181,396	0	-	1	0.0006	-
CIT					0	-	10	0.0055	-
BTD	21	1:8,638			34	0.0187	0.38		
CBSD HCU	1	1:181,396			10	0.0055	0.09		
MTHFRD HCU	0	-			3	0.0017	-		
Total					767	1:1,043	5,464	0.6387	0.12
Note: 15 CF patients escaped screening detection in the reference period. The corrected prevalence is 1:5,887.									
Abbreviations: ARG: argininemia, BTD: biotinidase deficiency, CACTD: carnitine-acylcarnitine translocase deficiency, CAH: congenital adrenal hyperplasia, CBSD HCU: cystathionine beta-synthase-deficient homocystinuria, CF: cystic fibrosis, CH: congenital hypothyroidism, CIT: citrullinemia, CPTID: carnitine palmitoyl transferase I deficiency, CPTIID: carnitine palmitoyl transferase II deficiency, FN: false negativity, FP: false positivity, FPR: false positive rate, GA I: glutaric aciduria type I (glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency), IVA: isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency (isovaleric acidemia), LCHADD: long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency, MCADD: medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, MSUD: maple syrup urine disease, MTHFRD HCU: methylenetetrahydrofolate reductase deficiency homocystinuria, PKU/HPA: phenylketonuria/hyperphenylalaninemia, PPV: positive predictive value, VLCADD: very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency.									

Table 5: Literary data on prevalence of screened rare diseases [18,20–22]

Disease	Prevalence
CH	1:2,600
PKU/HPA	1:2,000–1:10,000
CF	1:3,000–1:13,500
CAH	1:14,000
MCADD	1:15,000
CBSD HCU	1:60,000
BTD	1:30,000–1:60,000
CIT	1:40,000
LCHADD	1:100,000
IVA	1:100,000
MSUD	1:150,000
VLCADD	1:11,000–1:100,000
CPTIID	1:100,000
ARG	1:1,000,000
CPTID	1:1,000,000
CACTD	1:1,000,000
GA I	Unknown
MTHFRD HCU	Unknown

Abbreviations: ARG: argininemia, BTD: biotinidase deficiency, CACTD: carnitine-acylcarnitine translocase deficiency, CAH: congenital adrenal hyperplasia, CBSH HCU: cystathionine beta-synthase-deficient homocystinuria, CF: cystic fibrosis, CH: congenital hypothyroidism, CIT: citrullinemia, CPTID: carnitine palmitoyl transferase I deficiency, CPTIID: carnitine palmitoyl transferase II deficiency, FPR: false positivity rate, GA I: glutaric aciduria type I (glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency), IVA: isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency (isovaleric acidemia), LCHADD: long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency, MCADD: medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, MSUD: maple syrup urine disease, MTHFRD HCU: methylenetetrahydrofolate reductase deficiency homocystinuria, PKU/HPA: phenylketonuria/hyperphenylalaninemia, VLCADD: very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency.

Table 6: Recommendation of diseases for newborn screening in Europe [29]

Basic group		Candidate group
Diseases with higher prevalence	Diseases with lower prevalence	
PKU/HPA, CH, CAH, CF, MCADD, Th	MSUD, GA I, GAL	BD, CPTIID, CACTD, GA II, HMGD, HCSD, HCU, IVA, BKT, LCHADD, LSD, 3MCC, TYR I, TYR II, TYR III, VLCADD, vitamin B12 deficiency, SCID, CMV
<p>Abbreviations: 3MCC: 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency; BD: biotinidase deficiency; BKT: β-ketothiolase deficiency; CACTD: carnitine-acylcarnitine translocase deficiency; CAH: congenital adrenal hyperplasia; CF: cystic fibrosis; CH: congenital hypothyroidism; CMV: congenital cytomegalovirus infection; CPTIID: carnitine palmitoyl transferase II deficiency; HCU: homocystinuria; HCSD: holocarboxylase synthetase deficiency; HMGD: HMG-CoA lyase deficiency; GA I, II: glutaric aciduria type I, II; GAL: galactosemia; IVA: isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency; LCHADD: long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency; LSD: lysosomal storage disorders; MCADD: medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency; MSUD: maple syrup urine disease; PKU/HPA: phenylketonuria/hyperphenylalaninemia; SCID: severe combined immunodeficiency; Th: thalassemia; TYR I, II, III: tyrosinemia type I, II, III; VLCADD: very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency.</p>		

References

1. Richter T, Nestler-Parr S, Babela R, Khan ZM, Tesoro T, Molsen E, et al. Rare Disease Terminology and Definitions – a Systematic Global Review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group. *Value Health*. 2015;18(6):906–14.
2. Council of the European Union. *Council Recommendation on an action in the field of Rare Diseases*. Luxembourg: Council of the European Union; 2009.
3. Government of the Czech Republic. National strategy of rare diseases 2010–2020. (Usnesení Vlády ČR č. 466 ze dne 14.6.2010 o Národní strategii pro vzácná onemocnění na léta 2010–2020). Prague: Government of the Czech Republic; 2010.
4. Votava F, Kozich V, Chrastina P, Peskova K, Adam T, Friedecky D, et al. Performance metrics of 5 years of newborn screening in the Czech Republic. *Int J Neonatal Screen*. 2016;2:69–70.
5. Wilson JM, Jungner YG. Principles and practise of mass screening for disease. *Bol Of Sanit Panam*. 1968;65:281–393.
6. Therrell BL, Padilla CD, Loeber JG, Kneisser I, Saadallah A, Borrajo GJ, et al. Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Semin Perinatol*. 2015;39:171–87.
7. Ministry of Health of the Czech Republic. Methodical guideline for neonatal laboratory screening and follow-up care. (Metodický návod k zajištění novorozeneckého laboratorního screeningu a následná péče). Prague: Ministry of Health of the Czech Republic; 2016. 11 p. Report No.: 6.
8. Blehova B, Pazoutova M, Bloudkova D, Krutilova O. Evaluation of screening for phenylketonuria after 6 years of existence of the laboratory. *Cesk Pediatr*. 1976;31:399–401.
9. Hnikova O, Kracmar P, Zelenka Z, Philipiova O, Fabianova J, Skvor J, et al. Screening of congenital hypothyroidism in newborns in Bohemia and Moravia. *Endocrinol Exp*. 1989;23:117–23.
10. Votava F, Novotna D, Kracmar P, Vinohradska H, Stahlova-Hrabincova E, Vrzalova Z, et al. Lessons learned from 5 years of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in the Czech Republic: 17-hydroxyprogesterone, genotypes, and screening performance. *Eur J Pediatr*. 2012;171:935–40.
11. Sommerburg O, Krulisova V, Hammermann J, Lindner M, Stahl M, Muckenthaler M, et al. Comparison of different IRT-PAP protocols to screen newborns for cystic fibrosis in three central European populations. *J Cyst Fibros*. 2014;13:15–23.
12. Chrastina P, Bartl J, Hornik P, et al. LCHAD deficiency – the most frequent fatty acid oxidation disorder in newborn screening in the Czech Republic. *Ces-slov Pediatr*. 2009;4:175–176.
13. Buyukgebiz A. Newborn screening for congenital hypothyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2006;19:1291–8.
14. Pourfarzam M, Zadhoush F. Newborn Screening for inherited metabolic disorders; news and views. *J Res Med Sci*. 2013;18:801–8.
15. Léger J, Olivieri A, Donaldson M, Torresani T, Krude H, van Vliet G, et al. European Society for Paediatric Endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:363–84.
16. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:4133–60.
17. Mayell SJ, Munck A, Craig JV, Sermet I, Brownlee KG, Schwarz MJ, et al. A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2009;8:71–8.
18. Van Spronsen FJ, Mj Van Wegberg A, Ahring K, et al. Key European guidelines for the diagnosis and management of patients with phenylketonuria. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2017;5:743–56.
19. Leonard JV, Dezateux C. Newborn screening for medium chain acyl CoA dehydrogenase deficiency. *Arch Dis Child*. 2009;94:235–38.
20. The portal for rare diseases and orphan drugs – [cited 2018 May 25]. Available from: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN
21. Orphanet Report Series – Prevalence of rare diseases: Bibliographic data – January 2018 – Number 2 – [cited 2018 May 30]. Available from: https://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_decreasing_prevalence_or_cases.pdf

22. Massie J, Curnow L, Gaffney L, Carlin J, Francis I. Declining prevalence of cystic fibrosis since the introduction of newborn screening. *Arch Dis Child*. 2010;95:531–3.
23. Vavrova V, Zemkova D, Skalicka V, Votava F. Problems in the diagnostics of cystic fibrosis – the need of newborn screening. (Problémy v diagnostice cystické fibrózy – potřeba novorozeneckého screeningu). *Čes-slov Pediat*. 2006;61:703–9.
24. Votava F, Kozich V, Chrastina P, Peskova K, Adam T, Friedecky D, et al. The results of expanded newborn screening in the Czech Republic. (Výsledky rozšířeného novorozeneckého screeningu v České republice). *Čes-slov Pediat*. 2014;69:77–86.
25. Loeber JG, Burgard P, Cornel MC, Rigter T, Weinreich SS, Rupp K, et al. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 1. From blood spot to screening result. *J Inherit Metab Dis*. 2012;35:603–11.
26. Frankova V, Votava F, Kozich V. Expansion of newborn screening for inherited metabolic disorders – ethical questions. (Etické aspekty rozšiřování novorozeneckého screeningu dědičných metabolických poruch). *Čes-slov Pediatr*. 2014;69:87–94.
27. Dhillon K, Ho T, Rich P, Xu D, Lorey F, She J, et al. An automated method on analysis of blood steroids using liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to population screening for congenital adrenal hyperplasia in newborns. *Clin Chim Acta*. 2011;412:2076–2084.
28. Ross LF, Clarke AJ. A historical and current review of newborn screening for neuromuscular disorders from around the world: lessons for the United States. *Pediatr Neurol*. 2017;77:12–22.
29. Burgard P, Rupp K, Linder M, et al. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 2 – From screening laboratory results to treatment, follow-up and quality assurance. *J Inherit Metab Dis*. 2012;35:613–625.
30. Svaton M, Sediva A, Mejstrikova E, et al. Differential diagnostics of immunodeficiency using antigen receptor excision circles in neonatal screening cards and in postnatal peripheral blood. The 8th European Regional Meeting of International Society of Neonatal Screening, Hungary, Budapest. *Orvosi Hetilap* 2012; 42.



Neonatal screening in the Czech Republic: increased prevalence of selected diseases in low birthweight neonates

Jan David¹ · Petr Chrastina² · Hana Vinohradská³ · Eva Al Taji¹ · Andrea Holubová⁴ · Eva Hlídková⁵ · Viktor Kozich² · Felix Votava¹

Received: 3 May 2018 / Revised: 13 August 2018 / Accepted: 13 August 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Neonates with low birthweight (LBW) represent a vulnerable population. This retrospective study analyzed the birth frequency of diseases detected by neonatal screening (NBS) in normal and LBW neonates in the Czech Republic. Between years 2002 and 2016, the number of screened disorders in the Czech Republic gradually increased from two to 13. Prevalence of screened diseases was calculated for cohorts ranging from 777,100 to 1,277,283 neonates stratified by birthweight. Odds ratio of the association of LBW with each disease was calculated and statistical significance was evaluated using the chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate. Three diseases were associated with higher risk of prevalence in LBW neonates, namely congenital hypothyroidism (OR 2.50, CI 1.92; 3.25), cystic fibrosis (OR 2.44, CI 1.51; 3.94), and long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD) (OR 7.74, CI 2.18; 27.42).

Conclusion: Although the underlying mechanisms are not well understood, results can be hypothesized that LBW (respectively prematurity) may lead to the secondary and often transitory hypothyroidism while cystic fibrosis and LCHADD may manifest already prenatally and result into preterm birth and LBW.

Viktor Kozich and Felix Votava contributed equally to this work.

Communicated by Mario Bianchetti

✉ Jan David
jan.david@fnkv.cz

Petr Chrastina
petr.chrastina@vfn.cz

Hana Vinohradská
vinohradska.hana@fnbrno.cz

Eva Al Taji
evataji@email.cz

Andrea Holubová
andrea.holubova@fnmotel.cz

Eva Hlídková
hlidkova@email.cz

Viktor Kozich
viktor.kozich@vfn.cz

Felix Votava
felix.votava@fnkv.cz

¹ Department of Children and Adolescents, Third Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Kralovske Vinohrady, Srobarova 1150/50, 100 34 Prague 10, Czech Republic

² Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Ke Karlovu 455/2, Prague, Czech Republic

³ Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno, Jihlavská 20, Brno, Czech Republic

⁴ Department of Biology and Medical Genetics, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, V Uvalu 84, Prague, Czech Republic

⁵ Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacky University and University Hospital Olomouc, I. P. Pavlova 185/6, Olomouc, Czech Republic

What is Known:

- The percentage of low birthweight (LBW) neonates in the Czech Republic has been increasing.
- Previously published studies reported positive association between LBW and congenital hypothyroidism and cystic fibrosis.

What is New:

- The association between LCHADD and LBW has not yet been described.
- LBW can be the first manifestation of cystic fibrosis and LCHADD.

Keywords Congenital hypothyroidism · Cystic fibrosis · Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency · Low birthweight · Neonatal screening

Abbreviations

17-OHP	17-Hydroxyprogesterone
CACTD	Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CAH	Congenital adrenal hyperplasia
CF	Cystic fibrosis
CH	Congenital hypothyroidism
CI	Confidence interval
CPT1D	Carnitine palmitoyl transferase I deficiency
CPT11D	Carnitine palmitoyl transferase II deficiency
GA I	Glutaric aciduria type I (glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency)
IMDs	Inherited metabolic disorders
IRT	Immunoreactive trypsinogen
IVA	Isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency (isovaleric acidemia)
LBW	Low birthweight
LCHADD	Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency
MCADD	Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency
MS/MS	Tandem mass spectrometry
MSUD	Maple syrup urine disease
NBS	Neonatal screening
OR	Odds ratio
P K U /	Phenylketonuria/hyperphenylalaninemia
HPA	
TSH	Thyroid-stimulating hormone
VLCADD	Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency

Introduction

Rare diseases represent a group of 6000–8000 disorders with population frequency less than 1:2000. Neonatal screening (NBS) is a prevention program for early detection and efficient treatment of selected rare diseases. NBS is based on analyzing the concentration of specific substances or demonstrating pathogenic allelic variants using dried blood samples.

Overall, the NBS program is comprised of several steps, namely a consistent pre-analytical process (e.g., standardization of sample collection, timing, repeated samples), a reliable analytical step (laboratory methods selection, storage, and utilization of samples), and a patient-centered post-analytical process (protocols or pathways used in case of positive or unclear findings).

In the Czech Republic, NBS expanded gradually, starting with phenylketonuria/hyperphenylalaninemia (PKU/HPA) in 1975 and addition of congenital hypothyroidism (CH) in 1985, followed by congenital adrenal hyperplasia (CAH) in 2006, and cystic fibrosis (CF) and nine inherited metabolic disorders (IMDs) in 2009. The latest expansion occurred in June 2016, when five additional IMDs were added; however, these are not the subject of this study.

The percentage of low birthweight (LBW) neonates (defined as a birthweight < 2500 g) in the Czech Republic has been slowly increasing over the past two decades. In 1975 6.20% neonates were born with LBW, in 1985 5.64%, in 1995 5.48%, in 2005 6.72%, and by 2015, the proportion of neonates with LBW had risen to 7.76% according to data of the Institute of Health Information and Statistics of the Czech Republic. This trend is due to, e.g., increasing age of mothers at delivery and associated comorbidities, and the general medical progress with increasing number of children conceived through in vitro fertilization, higher number of children from multiple pregnancies, and improvement in perinatology care [1, 2].

Previously published studies reported positive association between LBW and CH [3, 4] and CF [5] but we did not find any reports on prevalence of LBW for other disorders screened by NBS. Consequently, the aim of this study was to analyze the prevalence of diseases screened by the NBS stratified by birthweight in neonates born in the Czech Republic between years 2002 and 2016.

Materials and methods

The monitored period, from January 1, 2002 till December 31, 2016, included three phases of NBS expansion. Dried blood spots were collected from the heel pricks of neonates and sent

to specified laboratories by mail. In the first phase (January 2002–January 2006), blood spots were taken between the 120th and 168th hour of neonatal life, in the second phase (February 2006–September 2009) between the 72nd and 96th hour, and in the third phase (October 2009–December 2016) between the 48th and 72th hour of neonatal life. Data on birthweight were available for 1,277,283 neonates (see Table 1) but information on gestational age was not available.

Dried blood spots were analyzed as follows:

- (1) thyroid-stimulating hormone (TSH) was determined using fluorescence immunoassay (Delfia® a AutoDelfia® produced by Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) for detection of CH [6];
- (2) 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) for detection of CAH (1,196,387 neonates, from February 2006 to 2016) was analyzed as above [7];
- (3) immunoreactive trypsinogen (IRT) for detection of CF was measured using AutoDelfia® (798,187 neonates (October 2009–2016)). In 8241 (1.03%) neonates from

this group with the highest IRT levels, a second tier testing of pathogenic variants in the *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) gene was performed (initially 32, then later 50 of the most frequent mutations were tested for using the Elucigene CF-EU1™ assay, Elucigene CF-EU2™ produced by Elucigene Diagnostics, Citylabs, Manchester, UK) in the original dried blood spots [8];

- (4) amino acids and acylcarnitines for detection of IMDs were determined by tandem mass spectrometry (MS/MS) using kits (MassChrom® Amino Acids and Acylcarnitines from Dried Blood - LC-MS/MS, derivatized and non-derivatized assays produced by Chromsystems, Grafelfing, Germany) and MS/MS instrumentation (API 2000™, API 3200™, and API 4000™ produced by AB Sciex, Prague, Czech Republic). In the period 2010–2016, a total of 777,100 neonates were screened for IMDs, namely PKU/HPA, medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD), long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD), very long

Table 1 Neonatal screening in the Czech Republic 2002–2016: numbers of screened neonates, neonates with a confirmed diagnosis, and neonates with a low birthweight (LBW)

Period	Neonates screened		Neonates detected	
	Total	With LBW	Total number with confirmed diagnosis	Number with LBW
Congenital hypothyroidism				
2002–2016	1,277,283	94,463	403	67
Congenital adrenal hyperplasia				
2006–2016	1,196,387	89,811	100	8
Cystic fibrosis				
2009–2016	798,187	60,477	120	20
Phenylketonuria/hyperphenylalaninemia				
2010–2016	777,100	61,638	139	13
Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency				
2010–2016	777,100	61,638	36	2
Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency				
2010–2016	777,100	61,638	10	4
Glutaric aciduria type I				
2010–2016	777,100	61,638	5	1
Isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency				
2010–2016	777,100	61,638	4	0
Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency				
2010–2016	777,100	61,638	2	0
Maple syrup urine disease				
2010–2016	777,100	61,638	2	0
Carnitine palmitoyl transferase I and II deficiency				
2010–2016	777,100	61,638	0	0
Carnitine–acylcarnitine translocase deficiency				
2010–2016	777,100	61,638	0	0

chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (VLCADD), carnitine palmitoyl transferase I and II deficiency (CPT1D and CPT2D), carnitine-acylcarnitine translocase deficiency (CACTD), maple syrup urine disease (MSUD), glutaric aciduria, type I (GA I), and isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency (IVA) [9].

Neonates with positive NBS findings were referred for follow-up to appropriate clinical departments. In the studied period, all screening positive patients underwent confirmatory testing. Diagnoses were confirmed using generally accepted diagnostic algorithms and neonates with a confirmed diagnosis received appropriate clinical care. Decision limits for the screened disorders are summarized in Tables 2 and 3, confirmatory test criteria in Table 4 [10–14]. The numbers of

confirmed cases detected by NBS were based on the feedback from clinical departments.

Prevalence of each of the screened diseases among neonates with normal and LBW (birthweight < 2500 g) was compared statistically in a retrospective study. Risk of association of LBW with each disease was calculated as the odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI); the statistical significance was tested using the chi-square test (critical value for 1 degree of freedom, 3.84) or Fisher's exact test as appropriate.

Results

In the neonate cohorts of varying size (for details, see Table 1), we identified 403 patients with confirmed CH (17% with

Table 2 Decision limits for analytes measured in dried blood spots

Disorder	Analyte	Decision limit (capillary blood)*
Congenital hypothyroidism	Thyroid-stimulating hormone (TSH)	TSH > 15.0 mIU/L
Cystic fibrosis	Immunoreactive trypsinogen (IRT)	IRT > 99. percentile (65.0 ng/mL) and <i>CFTR</i> mutation on least one allele
Congenital adrenal hyperplasia	17-hydroxyprogesterone (17-OHP)	17-OHP according to birthweight, see Table 3
Phenylketonuria/hyperphenylalaninemia	Phenylalanine (Phe) Tyrosine (Tyr)	Phe > 120 $\mu\text{mol/L}$ and Phe/Tyr ratio > 2.00
Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	Octanoylcarnitine (C8) Acetylcarnitine (C2)	C8 > 0.40 (0.50) $\mu\text{mol/L}$ and C8/C2 ratio > 0.02 (0.05) $\mu\text{mol/L}$
Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency	Hydroxypalmitoylcarnitine (C16OH) Hydroxyoleoylcarnitine (C18:1OH)	C16OH > 0.10 (0.07) $\mu\text{mol/L}$ or C18:1OH > 0.10 (0.05) $\mu\text{mol/L}$
Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	Tetradecenoylcarnitine (C14:1) Acylcarnitine (C2) Palmitoylcarnitine (C16)	C14:1 > 0.55 (0.30) $\mu\text{mol/L}$ and C14:1/C2 ratio > 0.03 and C14:1/C16 ratio > 0.26 (0.15)
Carnitine palmitoyl transferase I deficiency	Free carnitine (C0) Palmitoylcarnitine (C16) Oleoylcarnitine (C18:1) Acetylcarnitine (C2)	C0 > 60.3 (40.0) $\mu\text{mol/L}$ and C0/(C16+C18) ratio > 25.0 and (C16+C18:1)/C2 ratio < 0.10
Carnitine palmitoyl transferase II deficiency	Palmitoylcarnitine (C16) Oleoylcarnitine (C18:1)	C16 > 5.06 (8.00) $\mu\text{mol/L}$ and (C16+C18:1)/C2 ratio > 0.35 (0.45)
Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency	Acetylcarnitine (C2)	
Glutaric aciduria type I	Glutaryl carnitine (GSDC) Octanoylcarnitine (C8) Palmitoylcarnitine (C16)	CSDC > 0.40 (0.56) $\mu\text{mol/L}$ and CSDC/C8 ratio > 5.40 (CSDC/C16 > 0.40)
Maple syrup urine disease	Leucine (Leu) Isoleucine (Isoleu) Hydroxyproline (Hyp) Alanine (Ala) Valine (Val) Tyrosine (Tyr) Phenylalanine (Phe)	Leu + Isoleu + Hyp > 270 $\mu\text{mol/L}$ (Leu > 300 $\mu\text{mol/L}$) and Leu/Ala ratio > 1.40 (1.30) or Leu + Val/Phe + Tyr > 3.79
Isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency	Isovaleryl/methylbutyrylcarnitine (C5) Free carnitine (C0) Propionylcarnitine (C3) Octanoylcarnitine (C8)	C5 > 1 (0.60) $\mu\text{mol/L}$ and C5/C0 ratio > 0.03 and C5/C3 ratio > 0.39 (C5/C8 ratio > 11.0)

*Decision limits for amino acids and acylcarnitines in parentheses are for the non-derivatized assays

Table 3 Decision limits for congenital adrenal hyperplasia (used from 2009)

		17-hydroxyprogesterone (nmol/L in capillary blood) according to sample timing (in postnatal hours)		
Gestational age (weeks)	Birthweight (g)	0–48	48–72	72–120
≤ 27	< 900	160	137	129
28	900–1099	137	117	110
29	1100–1299	117	100	94.0
30	1300–1499	99.0	85.0	80.0
31	1500–1699	84.0	71.0	67.0
32	1700–1899	70.0	60.0	56.0
33	1900–2099	57.0	49.0	46.0
34	2100–2299	46.0	40.0	37.0
35	2300–2499	37.0	31.0	30.0
36	2500–2699	30.0	30.0	25.0
≥ 37	≥ 2700	23.0	20.0	20.0

Decision limits between 2006 and 2009 were approximately 20% higher due to the use of different kits and later sample collection

LBW), 139 patients with confirmed PKU/HPA (9% with LBW), 120 patients with confirmed CF (17% with LBW), 100 patients with confirmed CAH (8% with LBW), 36 patients with confirmed MCADD (6% with LBW), 10 patients with LCHADD (40% with LBW), 5 patients with GA I (20% with LBW), 4 patients with IVA (0 with LBW), 2

Table 4 Criteria for confirmation of screened disorders

Disorder	Definition (venous blood sample)
Congenital hypothyroidism	Thyroid-stimulating hormone (TSH) > 8.00 mIU/L or free thyroxine (fT4) < 12.0 pmol/L
Cystic fibrosis	Sweat test ≥ 60.0 mmol/L or 30.0–59.0 mmol/L and two pathogenic mutations in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (<i>CFTR</i>) gene
Congenital adrenal hyperplasia	Basal level of 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) above reference range and/or positive cosyntropin test and casual mutation in <i>CYP21A2</i> gene
Phenylketonuria/hyperphenylalaninemia	Phenylalanine (Phe) > 120 μmol/L
Medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency	Octanoylcarnitine (C8) and acetylcarnitine (C2) above reference range, and MCAD deficiency or two pathogenic mutations in <i>ACADM</i> gene or decreased fatty acid oxidation (FAO) in lymphocytes
Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) deficiency	Hydroxypalmitoylcarnitine (C16OH) and hydroxyoleoylcarnitine (C18:1OH) above reference range, and LCHAD deficiency or two pathogenic mutations in <i>HADHA</i> gene decreased FAO in lymphocytes
Very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency	Tetradecenoylcarnitine (C14:1) and acetylcarnitine (C2) and palmitoylcarnitine (C16) above reference range, and VLCAD deficiency or two pathogenic mutations in <i>ACADVL</i> gene or decreased FAO in lymphocytes
Carnitine palmitoyl transferase (CPT) I deficiency	Free carnitine (C0) and palmitoylcarnitine (C16) and oleoylcarnitine (C18:1) and acetylcarnitine (C2) above reference range, and CPT I deficiency or two pathogenic mutations in <i>CPT1A</i> gene or decreased FAO in lymphocytes
Carnitine palmitoyl transferase (CPT) II deficiency	Palmitoylcarnitine (C16) and oleoylcarnitine (C18:1) and acetylcarnitine (C2) above reference range, and CPT II deficiency or two pathogenic mutations in <i>CPT2</i> gene
Carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) deficiency	Palmitoylcarnitine (C16) and oleoylcarnitine (C18:1) and acetylcarnitine (C2) above reference range, and CACT deficiency or two pathogenic mutations in <i>SLC25A20</i> gene
Glutaric aciduria type I	Glutaryl carnitine (G5 DC) and octanoylcarnitine (C8) and palmitoylcarnitine (C16) above reference range, and glutaryl CoA dehydrogenase deficiency or two pathogenic mutations in <i>GCD</i> gene
Maple syrup urine disease	Leucine (Leu) and isoleucine (Isoleu) and hydroxyproline and alanine (Ala) and valine (Val) and tyrosine (Tyr) and phenylalanine (Phe) above reference range, and branched-chain ketoacid dehydrogenase (BCKAD) deficiency or two pathogenic mutations in <i>BCKDHA</i> gene or <i>BCKDHB</i> gene or <i>DBT</i> gene
Isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency	Isovaleryl/methylbutyrylcarnitine (C5) and free carnitine (C0) and propionylcarnitine (C3) and octanoylcarnitine (C8) above reference range, and isovaleryl CoA dehydrogenase deficiency or two pathogenic mutations in <i>IVD</i> gene

Table 5 Mean, median, and range of birthweight in neonates with confirmed diagnosis

Disorder	Mean (g)	Median (g)	Range (g)
Congenital hypothyroidism	3075	3200	330–5600
Congenital adrenal hyperplasia	3329	3350	1150–4715
Cystic fibrosis	3019	3150	600–4000
Phenylketonuria/hyperphenylalaninemia	3231	3270	745–4550
Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	3032	3100	1520–4000
Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency	2490	2705	1280–3720
Glutaric aciduria type I	3030	3590	1670–3830
Isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency	3040	3000	2780–3340
Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	3020	3020	2820–3220
Maple syrup urine disease	3790	3790	3780–3800

patients with VLCADD (0 with LBW), and 2 patients with MSUD (0 with LBW). Birthweight of the patient cohorts (mean, median, and range) are shown in Table 5.

We observed a higher prevalence of three of the screened diseases in neonates with LBW (see Fig. 1). A statistically significant increased risk of LBW was found for CH (OR 2.50, CI 1.92; 3.25), CF (OR 2.44, CI 1.51; 3.94), and LCHADD (OR 7.74, CI 2.18; 27.42). The risk of LBW was not associated with the other screened diseases, i.e., CAH and other IMDs (see Fig. 1 and Table 6).

Discussion

Our study showed a positive association between LBW and frequency of CH, CF, and LCHADD. It is unclear whether the LBW in these patients was due to hypotrophy of the fetuses born in term or whether the newborns were delivered preterm.

Unfortunately, association of the screened disorders with gestational age could not be evaluated in this study due to paucity of data on gestational age. It has been demonstrated that LBW is primarily a consequence of prematurity [15]. In our opinion, it is possible to apply this association to prematurity (gestational age < 37 weeks) considering discrepancies due to normal percentile distribution of birthweight and gestational age. Thus, the large for gestational age neonates (birthweight > 90th percentile) would strengthen this association while the small for gestational age neonates (birthweight < 10th percentile) would weaken it.

The cause-and-effect relationship of associations between LBW and risk of the three diseases is unclear. The higher incidence of these disorders may be secondary to LBW (or prematurity), or conversely LBW and prematurity may be a result of the prenatal onset of the disease in the fetus.

Previously published data reported positive association between LBW and CH [3, 4]. The problem of thyroid axis

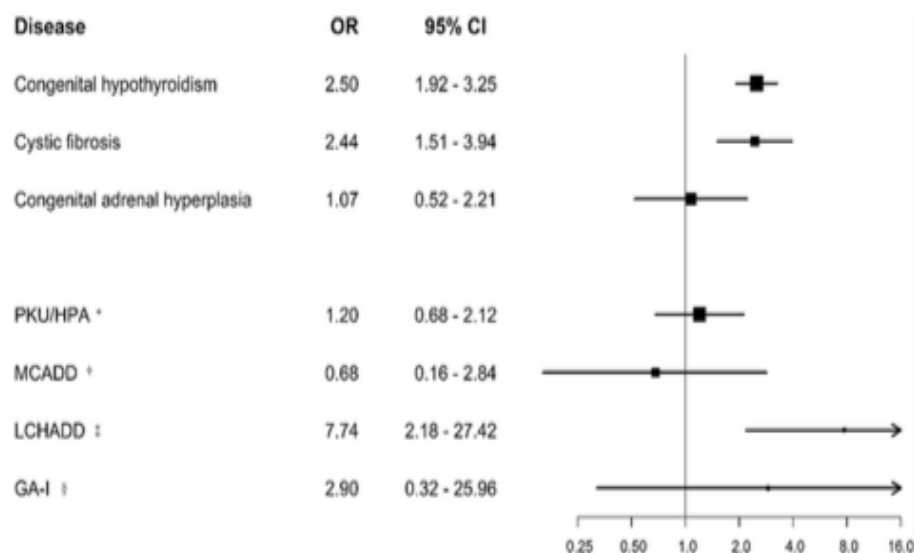


Fig. 1 Risk of screened disorders in low birthweight neonates. Asterisk indicates phenylketonuria/hyperphenylalaninemia, dagger indicates medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, double dagger

indicates long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency, section sign indicates glutaric aciduria type I

Table 6 Statistical evaluation of differences in frequency of disorders between neonates with normal and low birthweight

Disorder	OR	95% CI	Statistical significance of difference	
			Chi-square	Fisher's exact test
Congenital hypothyroidism	2.50	1.92–3.25	<0.001	–
Cystic fibrosis	2.44	1.51–3.94	<0.001	–
Congenital adrenal hyperplasia	1.07	0.52–2.21	0.852	–
Phenylketonuria/hyperphenylalaninemia	1.20	0.68–2.12	0.535	–
Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	0.68	0.16–2.84	–	0.448
Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency	7.74	2.18–27.42	–	0.006
Glutaric aciduria type I	2.90	0.32–25.96	–	0.339

dysbalances in preterm born or LBW neonates has multiple aspects. It is necessary to take into account both thyroidal and extrathyroidal factors (e.g., reduced secretion of thyroliberin, reduced reaction of thyroid gland to TSH stimulation, immature organizational mechanisms of the thyroid gland, reduced peripheral conversion of thyroxin to triiodothyronine and others), keeping in mind that these dysbalances are often transient [16]. Higher prevalence of CH in LBW neonates can be explained by a higher incidence of the transient forms in these patients compared to neonates with normal birthweight [17, 18]. This fact emphasizes the importance of reevaluation of the thyroid axis after 3 years and follows the recommendation of the European Society for Pediatric Endocrinology [10]. Previously published data reported 28% of transient cases among children with CH [19]. The above facts strongly suggest that CH does not lead to preterm delivery and/or LBW (in contrast to congenital hyperthyroidism) [20] and lend support to the hypothesis that LBW newborns are at higher risk of developing CH. On the other hand, it is important to keep in mind that LBW neonates with CH can be conversely at higher risk of false negativity due to delayed TSH increase [21], and that rescreening is a suitable option to detect such patients [22].

Previously published studies also reported positive association between LBW and CF with a relative risk of 2.66 [5]. Since CF is a genetic disorder, LBW cannot produce mutations in the *CFTR* gene and cannot be the cause of this autosomal recessive disease. It has been hypothesized that CF can affect intrauterine growth through several mechanisms. The fetus itself may be affected by pancreatic insufficiency [23]. Moreover, the maternal contribution to prematurity may result from abnormal expression of the *CFTR* protein at the maternal side of placenta leading to placental insufficiency [24] and malnutrition of the fetus.

Our study also identified another genetic disease—LCHADD—as a risk factor for LBW. This association has not yet been described and additional studies are needed to confirm independently our data. Nevertheless, previous reports showed that pregnancies in heterozygous females with a fetus affected by LCHADD had higher prevalence of third

trimester pregnancy complications (e.g., acute fatty liver of pregnancy, HELLP syndrome, and preeclampsia/eclampsia) and preterm delivery [25–27]. In addition, the neonates with LCHADD may exhibit cardiomyopathy early after birth indicating a possible fetal onset of the disease. The combination of maternal and fetal factors is the likely cause of grossly increased risk of LBW in neonates with LCHADD.

The results of our study may have some practical consequences. Firstly, LBW can be the first manifestation of certain genetic diseases in the neonate, which may be important for management of LBW neonates with CF and LCHADD. Secondly, neonates with LBW are qualified for the higher attention due to an increased risk of manifestation of CH. Thirdly, the lack of association between LBW and CAH may lead to improved decision limits for 17-OHP and subsequently to improvement of NBS parameters for CAH, with reduction of false-positive results [28].

Authors' contributions Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

Funding Institutional support was provided by the project DRO VFN64165 from the Ministry of Health of the Czech Republic and by the projects Progres Q26 and Q36 from Charles University.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Informed consent For this type of study, formal consent is not required. This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Cheong JL, Doyle LW (2012) Increasing rates of prematurity and epidemiology of late preterm birth. *J Paediatr Child Health* 48:784–788
- Ananth CV, Vintzileos AM (2006) Epidemiology of preterm birth and its clinical subtypes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 19:773–782

3. Dalili S, Rezvany SM, Dadashi A, Medghalchi A, Mohammadi H, Dalili H, Mirzanejad M, Gholamnezhad H, Amirhakimi A (2012) Congenital hypothyroidism: a review of the risk factors. *Acta Med Iran* 50:735–739
4. Waller DK, Anderson JL, Lorey F, Cunningham GC (2000) Risk factors for congenital hypothyroidism: an investigation of infant's birth weight, ethnicity, and gender in California, 1990–1998. *Teratology* 62:36–41
5. Festini F, Taccetti G, Repetto T, Reali MF, Campana S, Mergni G, Marianelli L, de Martino M (2005) Gestational and neonatal characteristics of children with cystic fibrosis: a cohort study. *J Pediatr* 147:316–320
6. Buyukgebiz A (2006) Newborn screening for congenital hypothyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab* 19:1291–1298
7. Votava F, Novotna D, Kracmar P, Vinohradská H, Stahlova-Hrabincova E, Vrzalova Z, Neumann D, Malikova J, Lebl J, Matern D (2012) Lessons learned from 5 years of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in the Czech Republic: 17-hydroxyprogesterone, genotypes, and screening performance. *Eur J Pediatr* 171:935–940
8. Sommerburg O, Krulisova V, Hammermann J, Lindner M, Stahl M, Muckenthaler M, Kohlmueller D, Happich M, Kulozik AE, Votava F, Balasckakova M, Skalicka V, Stopsack M, Gahr M, Macek M Jr, Mall MA, Hofmann GF (2014) Comparison of different IRT-PAP protocols to screen newborns for cystic fibrosis in three central European populations. *J Cyst Fibros* 13:15–23
9. Pourfarzam M, Zadhoush F (2013) Newborn screening for inherited metabolic disorders: news and views. *J Res Med Sci* 18: 801–808
10. Léger J, Olivieri A, Donaldson M, Torresani T, Krude H, van Vliet G, Polak M, Butler G (2014) European Society for Paediatric Endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 99:363–384
11. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, Meyer-Bahlburg HF, Miller WL, Montori VM, Oberfield SE, Ritzen M, White PC, Endocrine Society (2010) Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 4133–4160
12. Mayell SJ, Munck A, Craig JV, Sermet I, Brownlee KG, Schwarz MJ, Castellani C, Southern KW (2009) A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 8:71–78
13. Van Spronsen F, Mj van Wegberg A, Ahring K, Bélanger-Quintana A, Blau N, Bosch AM, Burlina A, Campistol J, Feillet F, Gizewska M et al (2017) Key European guidelines for the diagnosis and management of patients with phenylketonuria. *Lancet Diabetes Endocrinol* 5:743–756
14. Leonard JV, Dezateux C (2009) Newborn screening for medium chain acyl CoA dehydrogenase deficiency. *Arch Dis Child* 94: 235–238
15. Duryea EL, Hawkins JS, McIntire DD, Casey BM, Leveno KJ (2014) A revised birth weight reference for the United States. *Obstet Gynecol* 124:16–22
16. Lee JH, Kim SW, Jeon GW, Sin JB (2015) Thyroid dysfunction in very low birth weight preterm infants. *Korean J Pediatr* 58:224–229
17. Bijarnia S, Wilcken B, Wiley VC (2011) Newborn screening for congenital hypothyroidism in very-low-birth-weight babies: the need for a second test. *J Inher Metab Dis* 34:827–833
18. Gaudino R, Garel C, Czernichow P, Léger J (2005) Proportion of various types of thyroid disorders among newborns with congenital hypothyroidism and normally located gland: a regional cohort study. *Clin Endocrinol* 62:444–448
19. Korzeniewski SJ, Grigorescu V, Kleyn M, Young WI, Birbeck G, Todem D, Romero R, Paneth N (2013) Transient hypothyroidism at 3-year follow-up among cases of congenital hypothyroidism detected by newborn screening. *J Pediatr* 162:177–182
20. Vaidya B, Campbell V, Tripp JH, Spyer G, Hattersley AT, Ellard S (2004) Premature birth and low birth weight associated with nonautoimmune hyperthyroidism due to an activating thyrotropin receptor gene mutation. *Clin Endocrinol* 60:711–718
21. Tylek-Lemańska D, Kumorowicz-Kopiec M, Starzyk J (2005) Screening for congenital hypothyroidism: the value of retesting after four weeks in neonates with low and very low birth weight. *J Med Screen* 12:166–169
22. Cavarzere P, Camilot M, Popa FI, Lauriola S, Teofoli F, Gaudino R, Vincenzi M, Antoniazzi F (2016) Congenital hypothyroidism with delayed TSH elevation in low-birth-weight infants: incidence, diagnosis and management. *Eur J Endocrinol* 175:395–402
23. Muller AE, Thamm B, Lietz T, Handrick W, Walter S (1999) Cystic fibrosis: a cause of reduced birth weight? *Eur J Pediatr* 158:264
24. Mylona P, Glazier JD, Greenwood SL, Sides MK, Sibley CP (1996) Expression of the cystic fibrosis (CF) and multidrug resistance (MDR1) genes during development and differentiation in the human placenta. *Mol Hum Reprod* 2:693–698
25. Strauss AW, Bennett MJ, Rinaldo P, Sims HF, O'Brien LK, Zhao Y, Gibson B, Ibdah J (1999) Inherited long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency and a fetal-maternal interaction cause maternal liver disease and other pregnancy complications. *Semin Perinatol* 23:100–112
26. Deltetto N, Maxit C, Marchione D, Szlago M, Schenone A, Besada CH, Vaccarezza M, Agosta G (2012) Long chain 3-hydroxyacyl-coA dehydrogenase deficiency, association with HELLP and magnetic resonance spectroscopy findings. *Arch Argent Pediatr* 110: 63–66
27. Karall D, Brunner-Krainz M, Kogelnig K, Konstantopoulou V, Maier EM, Möslinger D, Plecko B, Sperl W, Wolkmar B, Scholl-Burgi S (2015) Clinical outcome, biochemical and therapeutic follow-up in 14 Austrian patients with Long-Chain 3-Hydroxy Acyl CoA Dehydrogenase Deficiency (LCHADD). *Orphanet J Rare Dis* 10:21
28. Anandi VS, Shaila B (2017) Evaluation of factors associated with elevated newborn 17-hydroxyprogesterone levels. *J Pediatr Endocrinol Metab* 30:677–681

Falešná pozitivita v novorozeneckém screeningu deficitu 21-hydroxylázy

Jan David, Monika Hedelová, Felix Votava

Klinika dětí a dorostu, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Šrobárova 1150/50, 100 34 Praha

Korespondující autor: MUDr. Jan David, Klinika dětí a dorostu, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Šrobárova 1150/50, 100 34 Praha, e-mail: jan.david@fnkv.cz, telefon: +420 267 162 819

Souhrn

Cíl: Deficit 21-hydroxylázy je v České republice ze všech osmnácti screenovaných nemocí zatížen nejvyšší frekvencí falešné positivity („*False Positivity Rate*“ – FPR). Cílem této práce bylo zjistit rozdíl FPR při hodnocení screeningových hodnot 17-hydroxyprogesteronu (17OHP) dle „cut-off“ vztažených k porodní hmotnosti (PH) a vůči gestačnímu věku novorozence.

Metody: Analýza zahrnovala 129 175 novorozenců z období 1. 1. 2015 až 31. 12. 2017, u kterých byla dostupná data o PH i gestačním věku. 17OHP byl stanoven v suchých kapkách krve (SKK) na novorozenecké screeningové kartičce fluorescenční imunoanalytickou metodou AutoDELFIA® PerkinElmer, firmy Wallac Oy, Finsko. Pozitivní nález (tj. koncentrace 17OHP nad „cut-off“ hodnotou) spustil další vyšetřovací proces. Ve většině případů se jednalo o vyžádání opakovaného odběru SKK. Pokud nedošlo k poklesu 17OHP pod „cut-off“ nebo při extrémně zvýšené koncentraci (tj. jednoznačné pozitivitě) 17OHP už v prvním pravidelném odběru SKK byl proband urgentně přijat na dětské oddělení k neodkladné confirmaci diagnózy a neodkladnému zahájení léčby. Rozdíl FPR mezi 17OHP vůči PH a gestačnímu věku byl vyhodnocen pomocí statistické metody *Adjusted Wald Interval for a Difference of Proportions with Matched Pairs* (software R program).

Výsledky: Ve sledované kohortě mělo celkem 393 novorozenců falešně pozitivní hodnotu 17OHP nad stávajícími „cut-off“ vztaženými k PH. Při použití „cut-off“ hodnot dle gestačního věku počet novorozenců s falešně pozitivní hodnotou 17OHP klesl na 295 při zachování stejné schopnosti detekce pacientů. Rozdíl FPR mezi oběma skupinami byl statisticky signifikantní.

Závěry: Hodnocení 17OHP vůči gestačnímu věku signifikantně sníží FPR a tím i zátěž zdravé části novorozenecké populace.

Klíčová slova: kongenitální adrenální hyperplázie, deficit 21-hydroxylázy, porodní hmotnost, gestační věk, falešná pozitivita, 17-hydroxyprogesteron

Summary

False positivity in newborn screening of 21-hydroxylase deficiency

Objective: False positive rate (FPR) in 21-hydroxylase deficiency screening tests is the highest of all screened diseases in the Czech Republic. The aim of this study was to evaluate the FPR for 17-hydroxyprogesterone (17OHP) decision limits based on gestational age and birthweight.

Methods: The study included 129,175 newborns in Bohemian region during the period 2015-2017. 17OHP was analysed using the immune-analytic method (AutoDELFIA® PerkinElmer by Wallac Oy, Finland). 411 newborns have been screened as positive newborns. FPR was compared by statistic method *Adjusted Wald interval for a difference of proportions with matched pairs* (Software R program).

Results: The diagnosis of 21-hydroxylase deficiency was confirmed in eighteen patients, 393 findings were false positive. Our study showed a statistically significant reduction of FPR using 17OHP decision limits based on gestational age with same sensitivity.

Conclusion: The evaluation of 17OHP decision limits based on gestational age reduced FPR and could decrease impacts on healthy part of population.

Keywords: congenital adrenal hyperplasia, 21-hydroxylase deficiency, birthweight, gestational age, false positivity, 17-hydroxyprogesterone

Úvod

Kongenitální adrenální hyperplázie (CAH) je autozomálně recesivně dědičná porucha steroidogeneze v kůře nadledvin. Nejčastějším typem (cca 95 % případů) je deficit 21-hydroxylázy. Klinické projevy a závažnost CAH závisí na zbytkové aktivitě deficitního enzymu a tím nejvíce na typu mutace v *CYP21A2* genu (tabulka 1) [1,2]. Enzym 21-hydroxyláza se účastní biosyntézy kortizolu a aldosteronu, konvertuje 17-hydroxyprogesteron (17OHP) na 11-deoxykortizol a progesteron na 11-deoxykortikosteron. Frekvence výskytu v České republice (ČR) je cca 1:12 000 [3].

Pravidelný celoplošný novorozenecký laboratorní screening (NLS) CAH, resp. deficitu 21 hydroxylázy, byl v ČR zahájen 7. února, resp. 1. listopadu (Praha, resp. Brno) 2006. Do 31. 12. 2017 bylo pomocí NLS detekováno 108 pacientů. Cílem NLS je včasným zachytem a včasnou léčbou zabránit rozvoji život ohrožující solné krize u nejtěžších forem onemocnění, resp. vzniku předčasné pseudopuberty s deficitem dospělé výšky u lehčích forem. NLS detekuje deficit 21-hydroxylázy pomocí zvýšených hladin 17OHP v suchých krevních kapkách (SKK) odebíraných novorozencům mezi 48. až 72. hodinou života. Dodržení tohoto intervalu je významné a nutné vzhledem k fyziologicky vyšším hodnotám 17OHP v prvních dnech života novorozence, což je dáno vyšší aktivitou enzymatického aparátu fetální kůry nadledvin [4]. Definice správných postupů v preanalytické, analytické a postanalytické části k zajištění NLS jsou shrnuty v Metodickém návodu ve Věstníku Ministerstva zdravotnictví ČR z roku 2016 [5].

Tab. 1. Dělení pacientů s deficitem 21-hydroxylázy dle fenotypové formy onemocnění, odpovídající zbytkové aktivitě 21-hydroxylázy (enzym P450c21) a patologie v genu pro P450c21 (*CYP21A2*), je použito aktuální genetické označení mutací platné od roku 2018 [1,2]

	Aktivita P450c21	Patologie genu <i>CYP21A2</i>	Léčba
Klasická forma Nejtěžší fenotyp se solnou poruchou – SW („salt wasting“)	0 – 1 %	delece, chimérické geny či stop mutace, <i>p.Q319*</i> , <i>p.I237N+p.V238E+p.M240K</i> , <i>c.923_924insT</i> , <i>p.R357W</i> na obou alelách	hydrokortizon fludrokortizon NaCl v prvním roce
Klasická forma Středně těžký fenotyp přechodný mezi se solnou poruchou a pouze virilizující – SW/SV („salt wasting/simple virilizing“)	1 – 5 %	<i>c.293-13C>G</i> na obou či lehčí alele	hydrokortizon fludrokortizon NaCl v prvních měsících
Klasická forma Středně lehký fenotyp pouze virilizující, bez solné poruchy –SV („simple virilizing“)	5 – 10 %	<i>p.I173N</i> na obou či lehčí alele	hydrokortizon fludrokortizon
Přechodná (pozdně vznikající) forma Lehký fenotyp – SV/LO („simple virilizing/late onset“)	> 10 %	<i>p.V282L</i> , <i>p.P31L</i> , <i>p.P454S</i> na obou či lehčí alele	hydrokortizon při klinických známkách a/nebo nedostatečné sekreci kortizolu

Hlavní rizika NLS představují falešně negativní (senzitivita) a falešně pozitivní (specifita) nálezy. Jejich výskyt nelze zcela eliminovat a je spjat s každou laboratorní metodou. Ideální screeningový test vykazuje dostatečnou senzitivitu i specifitu. Jsou to však spojené nádoby, jejichž hladiny při hodnocení biomarkerů jdou proti sobě. 17OHP je měřen imunofluorescenční metodou, s relativně vysokou frekvencí falešné positivity („False Positivity Rate“ – FPR) a tím nižší pozitivní prediktivní hodnotou (PPV) [6]. Deficit 21-hydroxylázy je v ČR ze všech osmnácti screenovaných nemocí zatížen nejvyšší FPR [3]. FPR představuje stigmatizaci zdravých novorozenců, zátěž pro jejich rodiny a vyšší nákladovost celého screeningového programu [7]. Cílem této studie bylo srovnat FPR při hodnocení screeningových hodnot 17OHP dle „cut-off“ vztažených k porodní hmotnosti (PH) a gestačnímu věku.

Metody

V období 1. 1. 2015 až 31. 12. 2017 bylo v regionu Čechy vyšetřeno celkem 215 291 novorozenců, což odpovídá cca 2/3 všech narozených dětí v ČR v tomto období [8,9]. U všech proběhl pravidelný odběr NLS mezi 48. a 72. hodinou života, tj. mezi druhým a třetím dnem života, pokud se datum narození považuje za den nultý. Data o PH a gestačním věku byla získána ze screeningových kartiček, které byly zasilány běžnou poštou do centrální screeningové laboratoře pro danou oblast v Praze. 17OHP byl stanoven v SKK fluorescenční imunoanalytickou metodou (AutoDELFIA® Perkin-Elmer, firmy Wallac, OY, Finsko).

Pozitivní nález (tj. koncentrace 17OHP nad „cut-off“ hodnotou) spustil další vyšetřovací proces. Ve většině případů se jednalo o vyžádání opakovaného odběru SKK. Pokud nedošlo k poklesu 17OHP pod „cut-off“ nebo při extrémně zvýšené koncentraci 17OHP již v prvním pravidelném odběru SKK byl proband urgentně přijat na dětské oddělení k neodkladné konfirmaci diagnózy a neodkladnému zahájení léčby.

Konfirmační diagnostika deficitu 21-hydroxylázy spočívala ve stanovení 17OHP ze žilní krve a průkazu patogenních mutací v genu *CYP21A2*, event. v případech diferencially diagnostických nejasností též ve stanovení dalších steroidů a provedení ACTH (adrenokortikotropní hormon) stimulačního testu.

Analyzovaná kohorta zahrnovala 129 175 dětí, u kterých byla dostupná data o porodní hmotnosti i gestačním věku (60,0 % ze všech screenovaných dětí ve sledovaném období). Rozdíl FPR mezi 17OHP vůči PH a gestačnímu věku byl vyhodnocen pomocí statistické metody *Adjusted Wald Interval for a Difference of Proportions with Matched Pairs* (software R program). Screeningové „cut-off“ hodnoty 17OHP v korelaci s PH, délkou gestace a věkem novorozence při odběru jsou shrnuty v tabulce 2 [10].

Tab. 2: Použité screeningové hodnoty 17-hydroxyprogesteronu: „cut-off“ hodnoty (nmol/l) ve vztahu k porodní hmotnosti, délce gestace a věku při odběru, upraveno dle [10]

		Věk při odběru (dny)											Jednoznačná pozitivita	
Gestační věk (týdny)	Porodní hmotnost (g)	2	3	4–6	7	8	9	10	11	12	13	14–19	20 a více	Bez ohledu na věk
≤ 27	< 900	160	137	129	141	144	143	139	134	128	124	108	20,0	200
28	900–1 099	137	117	110	121	123	122	119	115	110	106	92,0	20,0	180
29	1 100–1 299	117	100	94,0	103	105	104	102	98,0	94,0	91,0	79,0	20,0	150
30	1 300–1 499	99,0	85,0	80,0	88,0	89,0	88,0	86,0	83,0	80,0	77,0	67,0	20,0	120
31	1 500–1 699	84,0	71,0	67,0	74,0	75,0	75,0	73,0	70,0	67,0	65,0	56,0	20,0	95,0
32	1 700–1 899	70,0	60,0	56,0	62,0	63,0	62,0	61,0	58,0	56,0	54,0	47,0	20,0	90,0
33	1 900–2 099	57,0	49,0	46,0	51,0	51,0	51,0	50,0	48,0	46,0	44,0	39,0	20,0	85,0
34	2 100–2 299	46,0	40,0	37,0	41,0	42,0	41,0	40,0	39,0	37,0	36,0	31,0	20,0	80,0
35	2 300–2 499	37,0	31,0	30,0	32,0	33,0	33,0	32,0	31,0	30,0	29,0	25,0	20,0	70,0
36	2 500–2 699	30,0	30,0	25,0	26,0	26,0	26,0	25,0	24,0	23,0	23,0	20,0	15,0	60,0
≥ 37	≥ 2 700	23,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	19,0	18,0	15,0	15,0	60,0

Výsledky

V celé vyšetřené skupině 215 291 novorozenců bylo potvrzeno osmnáct pacientů s deficitem 21-hydroxylázy (medián 17OHP v prvním pravidelném odběru SKK 287 nmol/l, rozpětí 31,2–1630 nmol/l). Žádný z detekovaných pacientů neměl screeningovou koncentraci 17OHP pod „cut-off“ hodnotou vztaženou vůči gestačnímu věku. Nejnižší koncentraci 31,2 nmol/l odpovídal „cut-off“ vztažený ke gestačnímu věku 20,0 nmol/l. U celkem 755 novorozenců byl nález falešně pozitivní (vztaženo k PH), což odpovídalo FPR 0,35 %, resp. u 510 novorozenců s PH < 2 500 g (FPR 2,95 %) a u 245 novorozenců s PH ≥ 2 500 g (FPR 0,12 %).

V analyzované kohortě 129 175 dětí mělo celkem 393 novorozenců falešně pozitivní hodnotu 17OHP nad stávajícími „cut-off“ vztaženými k PH (medián 39,0 nmol/l, rozpětí 20,1–1080 nmol/l). V této skupině nebylo podezření na deficit 21-hydroxylázy následným vyšetřením prokázáno: jednak poklesem 17OHP pod „cut-off“ v opakovaném odběru SKK (380 případů, 260 novorozenců s PH < 2500 g, 120 novorozenců s PH ≥ 2500 g) nebo negativním endokrinologickým vyšetřením z venózní krve (třináct případů, sedm novorozenců s PH < 2500 g, šest novorozenců s PH ≥ 2500 g).

Při použití „cut-off“ hodnot vztažených ke gestačnímu věku klesl počet novorozenců s falešně pozitivní hodnotou 17OHP na 295 při zachování stejné schopnosti detekce pacientů (tabulka 3). Statistické vyhodnocení významnosti rozdílu FPR v jednotlivých letech (PH versus gestační věk) ukazuje tabulka 4. V analyzované kohortě ve sledovaném období vedlo použití „cut-off“ hodnot 17OHP vztažených na gestační věk k signifikantnímu snížení FPR na 0,23 % oproti původním 0,30 % (při použití „cut-off“ hodnot dle PH). Senzitivita zůstala zachována.

Tab. 3: Přehled výsledků analyzované kohorty novorozenců s pozitivním nálezem (tj. koncentrace 17-hydroxyprogesteronu nad „cut-off“) v pravidelném odběru novorozeneckého screeningu deficitu 21-hydroxylázy v období 2015–2017

		2015	2016	2017	Celkem
Počet analyzovaných novorozenců		42 542	43 276	43 357	129 175
Vztaženo k porodní hmotnost	Počet falešně pozitivních novorozenců	130	110	153	393
	Frekvence falešné positivity (%)	0,31	0,25	0,35	0,30
	Pozitivní prediktivní hodnota (PPV)	0,05	0,05	0,03	0,04
Vztaženo ke gestačnímu věku	Počet falešně pozitivních novorozenců	97	80	118	295
	Frekvence falešné positivity (%)	0,23	0,18	0,27	0,23
	Pozitivní prediktivní hodnota (PPV)	0,07	0,07	0,04	0,06

Tab. 4: Statické vyhodnocení významnosti rozdílu frekvencí falešné positivity v jednotlivých letech (porodní hmotnost versus gestační věk). Metoda *Adjusted Wald Interval for a Difference of Proportions with Matched Pairs*, odhadovaný parametr testovací statistiky leží v 95% intervalu spolehlivosti, který nepokrývá nulu

	2015	2016	2017	celkem
Odhad	0,000776	0,000693	0,000807	0,000759
95% interval spolehlivosti	0,000507; 0,001044	0,000441; 0,000945	0,000536; 0,001078	0,000608; 0,000910

Diskuze

NLS deficitu 21-hydroxylázy v ČR i v zahraničí vykazuje vysokou efektivitu [11–14]. Interpretace screeningových hodnot 17OHP je komplikovaná, závislá na postnatálním věku při odběru, gestačním věku, PH novorozence a jeho aktuální klinické situaci (stimulaci ACTH osy, např. hypoxií, septickým stavem či intrakraniálním krvácením) [15]. Gestační věk a PH nepřímo úměrně koreluje s hodnotou 17OHP [16] a FPR [17]. PH lze považovat za parametr objektivnější a spolehlivější. Gestační věk se pouze odhaduje, avšak studie prokazují, že délka gestace lépe koreluje s hodnotami 17OHP [18].

Výsledky této studie prokázaly statisticky významný pokles FPR při hodnocení 17OHP dle gestačního věku novorozence. Potvrzují tak již dříve publikovaná data, která však byla provedena na menším vzorku dětí [19,20]. Na druhé straně je nutné uvést, že použití korelace koncentrací 17OHP vůči gestačnímu věku sice významně snižuje FPR, ale neefektivnějším nástrojem pro její další snížení je použití druhostupňových analýz přímo v originálních SKK, kde byla zjištěna koncentrace 17OHP nad „cut-off“ hodnotou. V tomto ohledu je v současné době neefektivnější stanovení profilu dalších steroidů pomocí tandemové hmotnostní

spektrometrie spojené s kapalinovou chromatografií – tzv. LC-MS/MS [1,21]. Tento postup je v ČR připravován.

Falešná pozitivita v NLS obecně představuje významnou zátěž pro zdravou část populace, zejména na psychický stav rodičů zdravých novorozenců vystavených navazujícímu vyšetřovacímu postupu. Rodiče jsou po určitou dobu vystaveni informaci, že jejich dítě může trpět závažným onemocněním. I když je dalšími vyšetřeními toto podezření vyvráceno, stres či obavy mohou u některých rodičů přetrvávat [7]. Falešně pozitivní nálezy přináší též ekonomický aspekt, vyžadují opakovaná vyšetření a tím tak zvyšují náklady celého screeningového programu.

Za zmínku stojí též falešná negativita v NLS deficitu 21-hydroxylázy. Falešně negativní nálezy se mohou objevit z důvodů technické či logistické chyby při odběru, nejčastější příčinou jsou však klinicky mírné formy nemoci. Z celého období fungování NLS deficitu 21-hydroxylázy v ČR (2006–2017) je nám známo šest pacientů (dva s klasickou formou a čtyři s neklasickou formou) s hodnotou 17OHP pod „cut-off“ (tabulka 5). U jednoho pacienta se však jednalo o „nepravou“ falešnou negativitu, protože před odběrem SKK byl léčen kortikoidy, u zbývajících pacientů šlo o skutečnou „biologickou“ falešnou negativitu. Z výše uvedeného vyplývá, že negativní screeningový výsledek obecně (nejen u deficitu 21-hydroxylázy) nevyklučuje danou nemoc z diferenciálně-diagnostické rozvahy, zpravidla se však jedná o klinicky mírnější formy.

Tab. 5: Přehled pacientů s deficitem 21-hydroxylázy, které novorozenecký screening v období 2006–2017 nedetekoval (známé falešně negativní nálezy)

Pacient	Rok narození	Poměr 17OHP (proband/cut-off)	Věk při diagnóze	Genotyp (lehčí alela)	Forma (dle genotypu)	Poznámka
1	2006	0,62	10 dní	<i>p.R357Q</i>	SV	Diagnóza stanovena na základě virilizme (Prader III)
2	2006	0,26	8 let	<i>p.V282L</i>	SV/LO	Diagnóza stanovena na základě pubarché praecox
3	2008	0,82	7,5 roku	<i>p.V282L</i>	SV/LO	Diagnóza stanovena na základě pubarché praecox
4	2008	0,73	7,2 roku	<i>p.V282L</i>	SV/LO	Diagnóza stanovena na základě pubarché praecox
5	2009	0,30	1 den	<i>c.293-13C>G</i>	SW/SV	<i>Pouze "laboratorní" falešná negativita, odběr screeningu na léčbě hydrokortizonem</i>
6	2013	0,49	1 měsíc	<i>p.V282L</i>	SV/LO	Diagnóza stanovena dle rodinné anamnézy
Zkratky: 17OHP: 17-hydroxyprogesteron, SV: klasická prostá virilizující forma, SV/LO: neklasická pozdní forma, SW/SV: klasická přechodná forma						

Závěr

Hodnocení screeningových hladin 17-hydroxyprogesteronu vůči gestačnímu věku významně sníží frekvenci falešné positivity při zachování stejné detekční schopnosti systému novorozeneckého laboratorního screeningu v České republice, a tím sníží negativní dopad a stigmatizaci zdravé části populace novorozenců a jejich rodin.

Literatura

1. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95 (9): 4133–60.
2. Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, et al. HGVS Recommendations for the description of sequence variants: 2018 Update. *Hum Mutat* 2018; 37: 564–9.
3. David J, Vinohradská H, Dejmeš P, et al. Epidemiologické hodnocení výsledků novorozeneckého screeningu kongenitální adrenální hyperplazie v České republice. XII. Český pediatričský sjezd s mezinárodní účastí, Hradec Králové, 15.-17.9.2016. Abstrakt in: *Česko-slov Pediatr* 2016; S1 (71): 42–3.
4. Van der Kamp HJ, Wit JM. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2004; 151 Suppl 3: U71–5.
5. Metodický návod k zajištění novorozeneckého laboratorního screeningu a následná péče, Praha (CZ): Ministerstvo zdravotnictví ČR; 2016. 11 p. 6.
6. Minutti CZ, Lacey JM, Magera MJ, et al. Steroid profiling by tandem mass spectrometry improves the positive predictive value of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89 (8): 3687–93.
7. Frankova V, Votava F, Kožich V. Etické aspekty rozšiřování novorozeneckého screeningu dědičných metabolických poruch. *Česko-slov Pediatr* 2014; 69: 87–94.
8. ÚZIS: Rodička a novorozenec. Dostupné: <http://www.uzis.cz/en/category/tematicke-rady/newborns>.
9. ČSÚ: Obyvatelstvo. Dostupné: <https://www.czso.cz/csu/czso/population>.
10. Blankenstein O, Stopsack M, Fingerhut R, et al. The ISNS 17OHP initiative: Establishing of 17OHP cut-off levels by international collaboration. The 6th European Regional Meeting in Neonatal Screening, Praha, 26.–28.4.2009. Abstrakt in: *Česko-slov Pediatr* 2009; 64 (4): 192–3.
11. Votava F, Kozich V, Chrastina P, et al. Performance metrics of 5 years of newborn screening in the Czech Republic. *Int J Neonatal Screen* 2016; 2: 69–70.
12. Tsuji A, Konishi K, Hasegawa S, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Tokyo, Japan from 1989 to 2013: a retrospective population-based study. *BMC Pediatr* 2015; 15: 209.
13. Heather NL, Seneviratne SN, Webster D, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand, 1994–2013. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100 (3): 1002–8.
14. Steigert M, Schoenle EJ, Biason-Laubler A, et al. High reliability of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Switzerland. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87 (9): 4106–10.
15. Anandi VS, Shaila B. Evaluation of factors associated with elevated newborn 17-hydroxyprogesterone levels. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2017; 30 (6): 677–81.
16. Gruñeiro-Papendieck L, Prieto L, Chiesa A, et al. Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia: adjustments to the recall protocol. *Horm Res* 2001; 55 (6): 271–7.
17. Slaughter JL, Meinzen-Derr J, Rose SR, et al. The effects of gestational age and birth weight on false-positive newborn-screening rates. *Pediatrics* 2010; 126 (5): 910–6.
18. Van der Kamp HJ, Oudshoorn CG, Elvers BH, et al. Cutoff levels of 17-alpha-hydroxyprogesterone in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia should be based on gestational age rather than on birth weight. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90 (7): 3904–7.
19. Torresani T, Grüters A, Scherz R, et al. Improving the efficacy of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by adjusting the cut-off level of 17 α -hydroxyprogesterone to gestational age. *Screening* 1994; 3 (2): 77–84.
20. Cavarzere P, Camilot M, Teofoli F, et al. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in North-Eastern Italy: a report three years into the program. *Horm Res* 2005; 63 (4): 180–6.
21. Fiet J, Le Bouc Y, Guéchet J, et al. A Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry Profile of 16 Serum Steroids, Including 21-Deoxycortisol and 21-Deoxycorticosterone, for Management of Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Endocr Soc* 2017; 1 (3): 186–201.

POSTUP U PACIENTA S PODEZŘENÍM NA DEFICIT 21-HYDROXYLÁZY ZACHYCENÉHO V NOVOROZENECKÉM SCREENINGU V ČR

PROCEDURE IN THE SUSPECTED CASE OF THE 21-HYDROXYLASE DEFICIENCY DETECTED IN CZECH NEWBORN SCREENING

JAN DAVID, FELIX VOTAVA

Klinika dětí a dorostu, 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

SOUHRN

Kongenitální adrenální hyperplazie (CAH) představuje skupinu vrozených poruch steroidogeneze s autozomálně recesivním přenosem. Nejčastějším typem je deficit 21-hydroxylázy. Klinické projevy a závažnost CAH jsou chápány jako kontinuum ve vztahu ke zbytkové aktivitě deficitního enzymu dané primárně typem mutace. Smyslem novorozeneckého screeningu CAH, resp. deficitu 21-hydroxylázy, je zabránit rozvoji život ohrožující solné krize u nejtěžších forem onemocnění, resp. vzniku předčasné pseudopuberty s deficitem dospělé výšky u lehčích forem. Celoplošné vyhledávání pomocí novorozeneckého screeningu spočívá ve stanovení sérové koncentrace 17-hydroxyprogesteronu (17-OHP) v suchých krevních kapkách, které jsou odebírány novorozencům mezi 48. a 72. hodinou života. Interpretace screeningových hodnot 17-OHP je komplikovaná, závislá nejen na porodní hmotnosti, resp. gestačním stádiu novorozence, ale i době odběru suché krevní kapky či aktuální klinické situaci novorozence. Screening je metoda vyhledávací, v konfirmační diagnostice využíváme laboratorní biochemické a molekulárněgenetické metody. Léčba je komplexní, zahrnuje zejména substituci kortizolu a aldosteronu a pečlivé sledování pacientů. Cílem článku je seznámit čtenáře s postupy užívanými v ČR při pozitivním screeningovém nálezu.

Klíčová slova: kongenitální adrenální hyperplazie (CAH), deficit 21-hydroxylázy, novorozenecký screening

SUMMARY

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) are represents a group of autosomal recessive diseases resulting from mutations of enzyme genes mediating biochemical steps of steroidogenesis. The most frequent type of CAH is 21-hydroxylase deficiency. Clinical symptoms and their severity are closely related to the level of the residual enzyme activity which depends on the type of mutation. The aim of newborn 21-hydroxylase deficiency screening is to avoid the known clinical outcomes – life-threatening salt-wasting form or precocious puberty and short stature. Population wide detection by means of newborn screening is performed by analysis of serum concentration of 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) in dried blood spots collected from the newborn at the age of 48 – 72 hours. The interpretation of screening values of 17-OHP is difficult, depending not only on the newborn weight or gestational age, but also on the time of sample collecting and on the overall newborn clinical situation. The screening results have to be confirmed subsequently by laboratory biochemical, molecular and genetic methods. CAH therapy includes supplying cortisol and aldosterone. The aim of this article is to present the process implemented in the Czech Republic for positive results of CAH screening.

Key words: congenital adrenal hyperplasia (CAH), 21-hydroxylase deficiency, newborn screening

Úvod

Kongenitální adrenální hyperplazie (congenital adrenal hyperplasia, CAH) je skupina nemocí představujících vrozenou poruchu syntézy steroidních hormonů

s autozomálně recesivním přenosem. Nejčastější typ CAH je **deficit 21-hydroxylázy** (asi 95 %), který je způsoben mutací v genu *CYP21A2*. Enzym 21-hydroxyláza je potřebný pro biosyntézu kortizolu a aldosteronu, konvertuje 17-hydroxyprogesteron (17-OHP) na 11-deoxykortizol a progesteron

Obr. 1: Zjednodušený přehled steroidogeneze z cholesterolu v kůře nadledvin (Lebl, 2013).



na 11-deoxykortikosteron (obr. 1). Frekvence výskytu klasické formy je v ČR asi 1 : 12 000 (David et al., 2016).

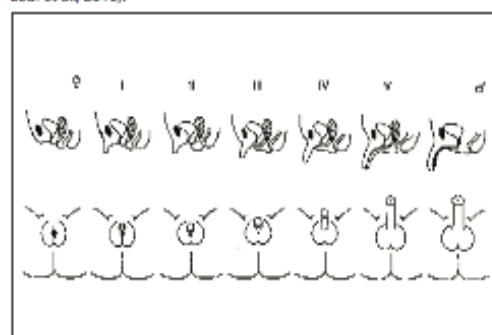
KLASIFIKACE A KLINICKÉ PROJEVY

Absolutní či relativní **deficit kortizolu** zpětnovazebným mechanismem zvyšuje sekreci adrenokortikotropního hormonu (ACTH), který stimuluje steroidogenezi, hromadí se steroidy před enzymatickým blokem, z nichž některé mají androgenní aktivitu, a zvýšeně se syntetizují i samotné androgeny, protože enzym 21-hydroxylázu nevyžadují. V organismu vzniká **hypokortikalismus**, **hypoaldosteronismus** a **hyperandrogenismus**. Fenotypické klinické projevy a závažnost CAH chápeme jako kontinuum ve vztahu ke zbytkové aktivitě 21-hydroxylázy dané primárně typem mutace v genu *CYP21A2*. Korelace genotypu a fenotypu, až na výjimky, je u CAH signifikantní (Sperling, 2002). Právě na základě této zbytkové aktivity můžeme deficit 21-hydroxylázy rozdělit do 4 fenotypů (tab. 1). První dvě formy představují ¾ pacientů s klasickou formou deficitu 21-hydroxylázy:

1. klasická forma se solnou poruchou (salt-wasting, SW),
2. klasická přechodná forma mezi se solnou poruchou a prostou virilizující (SW/SV),
3. klasická forma prostá virilizující (simple virilizing, SV),
4. neklasická forma pozdně nastupující (late onset, LO).

U nejtěžších forem se chlapci rodí pouze se známkami hyperpigmentace nápadné především v oblasti skrota a klinicky neuchopitelným zvětšením penisu a bez jiných klinických nápadností. Po vyčerpání mineralokortikoidů, placentárně přenesených od matky, se mezi 2. a 5. týdnem života rozvíjí metabolický rozvrat v důsledku nadledvinové insuficience – tzv. **solná krize** (závažná hyponatremie,

Obr. 2: Praderova stupnice hodnotící závažnost virilizace genitálu (podle Lebl et al., 2016).



Typ Prader I je charakterizován hypertrofií klitoris, typy Prader II-IV postupnou fúzí labií, peniformní klitoris s hypospadicky vyústěnou uretrou, typ Prader V se již značně podobá chlapeckému genitálu, avšak skrotum je bez varlat.

hyperkalemie, hypoglykemie, metabolická acidóza s rizikem poškození CNS nebo i úmrtí). U dívek lze navíc pozorovat virilizaci genitálu různého stupně (Praderova stupnice I-V, obr. 2). Nejvyšší stupeň virilizace může vést k chybnému určení pohlaví („chlapec“ s kryptorchismem). U lehčích forem dominuje předčasná pseudopuberta s růstovou akcelerací a předčasným pubarché. Virilizace genitálu u dívek bývá nižšího stupně a může uniknout klinické pozornosti. Neklasická forma se manifestuje v pozdějším věku, většinou v období puberty nebo až v dospělosti známkami hyperandrogenismu (zejména hirsutismus či primární amenorea).

LABORATORNÍ NOVOROZENECKÝ SCREENING

Smyslem **novorozeneckého screeningu** (NS) CAH, resp. deficitu 21-hydroxylázy, je včasným záchytem a včasnou léčbou zabránit rozvoji život ohrožující solné krize u nejtěžších forem onemocnění, resp. vzniku předčasně pseudopuberty s deficitem dospělé výšky u lehčích forem (Votava et al., 2012). Od roku 2006, kdy v ČR probíhá toto celoplošné vyhledávání, žádný zachycený pacient neprodělal klinicky manifestní solnou krizi (David et al., 2016).

Definice správných „lege artis“ postupů v preanalytické, analytické a postanalytické části k zajištění novorozeneckého screeningu je shrnuta v **Metodickém návodu** ve Věstníku Ministerstva zdravotnictví České republiky (MZ ČR), který byl naposledy aktualizován v červnu 2016 (Ministerstvo zdravotnictví, 2016). Tento návod se týká i ostatních vyhledávaných onemocnění.

Screening spočívá ve stanovení **koncentrace 17-OHP** v suché krevní kapce odebrané novorozencům mezi 48. až

Tab. 1: Vztah fenotypu a aktivity 21-hydroxylázy (Kliegman, 2011).

Forma	fenotyp	aktivita 21-hydroxylázy	hypokortikalismus	hypoaldosteronismus	hyperandrogenismus
klasická	solná porucha	0–1 %	++	++	++
	přechodná forma	1–5 %	++	+–	++
	prostá virilizující	5–10 %	+	+–	++
neklasická	pozdně nastupující	10–50 %	+–	–	+

72. hodinou života. Dodržení tohoto intervalu je významné vzhledem k fyziologicky vyšším hodnotám 17-OHP v prvních dnech života novorozence, což je dáno vyšší aktivitou enzymatického aparátu fetální kůry nadledvín. 17-OHP je stanoven imunofluorescenční metodou, jejíž nevýhodou je relativně vysoká míra falešné pozitivita a tím nižší pozitivní prediktivní hodnota (David et al., 2016). Ta by se mohla navýšit po zařazení dalšího diagnostického kroku, a to tekutinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrofotometrií (LC-MS/MS). Výsledky z jiných zahraničních screeningových programů ukazují, že právě zařazení této metody jako druhého stupně NS CAH, resp. deficitu 21-hydroxylázy, zvýší pozitivní prediktivní hodnotu a sníží falešnou pozitivitu (Speiser et al., 2010).

Interpretace screeningových hladin 17-OHP je komplikovaná, závislá vedle postnatálního věku při odběru, který se musí dodržovat, především na gestačním věku novorozence (resp. porodní hmotnosti), jeho klinické situaci (stimulaci ACTH osy, např. hypoxií, septickým stavem či intrakraniálním krvácením). Pro praktické rozhodování je interpretace hladin rozdělena do 3 kategorií: **jednoznačná negativita** (tj. pod cut-off hodnotou), **jednoznačná pozitivita** a **„šedá“ nejednoznačná zóna** mezi jednoznačnou pozitivitou a negativitou. Tabulka 2 ukazuje tato pásma používaná v ČR.

Nejednoznačný nález v „šedé“ zóně a bez jiných klinických okolností vedoucích ke zvýšenému podezření na deficit 21-hydroxylázy se řeší opakovaním odběru suché kapky s časovým odstupem 1–2 týdnů od posledního náběru (tzv. „recall“ na základě výzvy screeningové laboratoře). Opakované odběry se musí provádět i z indikace klinických okolností novorozence, při hladinách 17-OHP pod cut-off. Jedná se o tzv. „rescreening“ a indikace jsou taxativně určeny v Metodickém návodu MZ ČR (tab. 3).

V případě jednoznačné pozitivity či přetrvávání hodnot 17-OHP v „šedé“ zóně se musí provést konfirmační diagnostika. Screening je metoda vyhledávací, nikoliv konfirmační. Naléhavost konfirmačního vyšetření může být časově bezodkladná, např. v případě zralého novorozence s hladinou 17-OHP v pásmu jednoznačné pozitivity; nebo časově méně naléhavá v případě nezralého novorozence s přetrváváním hladin 17-OHP v „šedé“ zóně.

Tab. 2: Interpretace screeningové hodnoty 17-OHP.

Gestační věk (týdny)	Porodní hmotnost (g)	17-OHP (nmol/l) ve věku 48–72 h		
		negativita (cut-off)	„šedá zóna“	jednoznačná pozitivita
≤ 27	< 900	< 137	137–200	> 200
28	900–1099	< 117	117–180	> 180
29	1100–1299	< 100	100–150	> 150
30	1300–1499	< 85	85–20	> 120
31	1 500–1699	< 71	71–95	> 95
32	1700–1899	< 60	60–90	> 90
33	1900–2099	< 49	49–85	> 85
34	2100–2299	< 40	40–80	> 80
35	2300–2499	< 31	31–0	> 70
36	2500–2699	< 30	30–60	> 60
≥ 37	> 2700	< 20	20–60	> 60

Tab. 3: Indikace opakovaného odběru suché krevní kapky („rescreening“). Důvody rescreeningu z hlediska deficitu 21-hydroxylázy jsou zvýrazněny (Ministerstvo zdravotnictví, 2016).

Novorozenci s porodní hmotností menší než 1500 g.
Novorozenci, jejichž matka byl v posledních 48 hodinách před porodem nebo novorozenci před odběrem screeningů podán celkové přípravek na bázi kortikoidů.
Novorozenci, jejichž matka byla v posledním trimestru těhotenství léčena tyreostatiky, léky s vysokým obsahem jodu (např. amiodaronem, nikoliv však běžnou suplementací jodidu v těhotenství) nebo jí byly podány jodové kontrastní látky.
Novorozenci, kteří byli léčeni před odběrem screeningů dopamínem, léky s obsahem jodu nebo jim byly podány jodové kontrastní látky.
Novorozenci, kterým byl podán transfuzní přípravek před odběrem screeningů.
Novorozenci, kterým byly v době 48 hodin před odběrem screeningů podány parenterálně roztoky aminokyselin, glukózy a/nebo lipidů.

KONFIRMAČNÍ DIAGNOSTIKA

Biochemická diagnostika z plně žilní krve je pro konfirmaci stěžejní. Pro klasickou formu je typicky zvýšená hodnota sérového 17-OHP a plazmatické koncentrace ACTH. U neklasické formy mohou být hodnoty 17-OHP v novorozeneckém období ve fyziologickém rozmezí.

Laboratorně obligatorně vyšetřujeme **natremii, kalemii**, případně, podle klinického rozhodnutí, glykemii a parametry acidobazické rovnováhy, ze steroidního spektra bezpodmínečně **17-OHP, 11-deoxykortikosteron, 11-deoxykortizol** a 21-deoxykortizol (neboť elevace 17-OHP může být i v důsledku vzácnějšího typu CAH – deficitu 11-hydroxylázy). Extrémně důležitý je odběr vzorku na steroidy před eventuálním nasazením substituce hydrokortizonem. Dále je vhodné doplnit koncentraci ACTH, plazmatickou reninovou aktivitu (PRA), ze steroidního spektra i dehydroepiandrosteron (DHEA), dehydroepiandrosteron-sulfát (DHEA-s) a androstendion. Je vhodné též objektivizovat odpady natria a kalía v moči.

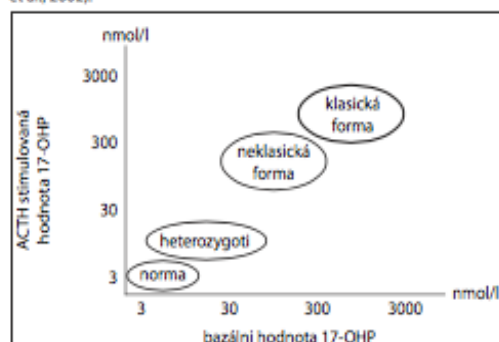
Při diferenciálnědiagnostických nejasnostech použijeme **ACTH (cosyntropinový, synacthenový) stimulační test**, který nám zhodnotí funkci nadledvín (homozygotní či heterozygotní deficit 21-hydroxylázy). Tento test spočívá v intravenózním podání syntetického ACTH (cosyntropinu) v bolusové dávce 1 ml/1,7 m², tj. pro novorozence asi 0,15–0,2 ml (Falhammer et al., 2015). Následně hodnotíme steroidní spektrum (kortizol, 17-OHP, 11-deoxykortikosteron, 11-deoxykortizol, 17-hydroxy-pregnenolon, DHEA, androstendion) v čase 0, tj. bazální hodnota, a 60 minut po podání, tj. stimulovaná hodnota. Hodnota stimulovaného kortizolu nad 550 nmol/l nebo minimálně dvojnásobný vzestup oproti původní hodnotě prokazuje dostatečnou sekreční kapacitu nadledvín, tj. nepotvrzuje hypokortikalismus. 17-OHP v 60. minutě méně než 30 nmol/l diagnózu deficitu 21-hydroxylázy vylučuje, nevylučuje však heterozygotní stav (Partsch et al., 2005). Interpretaci nálezů shrnuje tabulka 4 a obrázek 3.

Z dalších diagnostických metod využíváme i funkční a zobrazovací metody. Vzhledem k riziku hyperkalemie je vhodné

Tab. 4: Interpretace ACTH stimulačního testu (Parsch et al., 2005).

Stimulovaná hodnota	Interpretace
kortizol (nmol/l)	
≤ 550	hypokortikalismus pravděpodobný
> 550	hypokortikalismus nepravděpodobný
17-OHP (nmol/l)	
< 30	deficit 21-hydroxylázy nepravděpodobný či heterozygotní stav
30–300	neklasická forma, vzácně heterozygotní stav
> 300	klasická forma

Obr. 3: Zjednodušená interpretace ACTH stimulačního testu (Sperling et al., 2002).



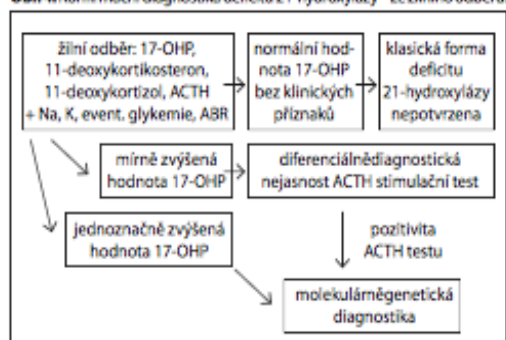
EKG vyšetření. Ze zobrazovacích metod využíváme **ultrasonografické vyšetření** nadledvin, které mohou být normální či zvětšené, avšak pro potvrzení deficitu 21-hydroxylázy vyšetření velikosti nadledvin nemá zásadní význam. U chlapeckého genitálu bez sestoupých varlat je nutné zobrazit i malou pánev k vizualizaci vnitřního genitálu a vyšetřit karyotyp pacienta.

Molekulárněgenetická diagnostika nepatří v některých zemích mezi základní diagnostické metody, diagnózu však definitivně potvrdí, v ČR se uplatňuje u každého pacienta. U deficitu 21-hydroxylázy obvykle genotyp velmi dobře koreluje s daným fenotypem, typ mutace CYP21A2 tedy napomůže k rozlišení klinické závažnosti (SW forma versus SV forma), protože v éře NS

Tab. 5: Vztah fenotypu a genotypu CYP21A2 (4,17).

klinická charakteristika choroby	mutace genu CYP21A2
klasická forma: nejtěžší fenotyp (SW)	delece genu, chimérický gen, nulové či stop mutace na obou alelách, např.: p.Q318X cluster E6 (p.I236+p.V237E+p.M239K) p.L307insT p.R356W
klasická forma: středně těžký fenotyp (SW/SV)	c.290-13A/C>G na obou či lehčí alele
klasická forma: středně lehký fenotyp (SV)	p.I172N na obou či lehčí alele
přechodná klasická/neklasická forma: lehký fenotyp (SV nebo LO)	p.V281L, p.P30L, p.P453S na obou či lehčí alele

Obr. 4: Konfirmační diagnostika deficitu 21-hydroxylázy – ze žilního odběru.



Indikací je nález jednoznačně pozitivní či opakovaný nález v „šedé zóně“ v suché krevní kapce či klinické podezření. Konkrétní normální koncentrace 17-OHP závisí na dané laboratoři a použité metodice profilování steroidů (za nejpřesnější metodiku lze v současnosti považovat LC-MS/MS). Za normální hodnotu 17-OHP lze považovat jednoznačně hodnotu 3 nmol/l a méně a za jednoznačnou pozitivitu hodnotu 300 nmol/l a více.

nedochází ke klinickému rozvoji solné krize. Složený heterozygot pro dvě mutace v genu CYP21A2 vykazuje fenotyp odpovídající lehčí formě. V současné době jsou popsány desítky mutací genu CYP21A2 (Sarafoglou et al., 2008). Po konfirmaci nemoci u pacienta nabídneme genetické vyšetření i jeho rodičům a sourozencům. Vztah fenotypu a genotypu shrnuje tabulka 5.

THERAPIE

V případě pozitivního nálezu v laboratorním NS a při konfirmaci jednoznačného zvýšení 17-OHP ze žilní krve, a zvláště jsou-li přítomny některé klinické známky CAH, je rozhodnutí o terapii jednoduché a neodkladné. Zahajujeme **substitucí glukokortikoidů hydrokortizonem** v dávce zpočátku vyšší, tj. 20–30 mg/m²/den ve 3 denních dávkách, postupně klesneme na obvyklou substituční dávku 10–15 mg/m²/den (Consensus Statement on 21-Hydroxylase Deficiency, 2002). Ranní dávka se užívá ihned po probuzení. Dávku hydrokortizonu je nutno **navýšit** v situacích vyšší potřeby glukokortikoidů v organismu, zejména při infekčním onemocnění či operačním zákroku. Subfebrilní pacient vyžaduje dávku hydrokortizonu dvojnásobnou, febrilní pacient trojnásobnou až čtyřnásobnou. Parenterální aplikaci hydrokortizonu volíme u pacientů při průjmech se zvracením. V kojeneckém věku jsou nejnebezpečnější akutní průjemová onemocnění (nejčastěji rotavirové etiologie s charakteristickými projevy hořečky, průjmu a zvracení), která mají za následek nižší resorpci perorálně podávaného hydrokortizonu. Pokud se v těchto situacích včas neaplikuje hydrokortizon parenterálně, může dojít k náhlému úmrtí v důsledku hypokortikalismu. Všichni pacienti s CAH jsou vybaveni kartičkou pro naléhavé situace s údajem o diagnóze a se základním doporučením léčby.

Další složkou léčby deficitu 21-hydroxylázy je **substituce mineralokortikoidů fludrokortizonem** v dávce většinou 50–100 (někdy i 200) µg/kg/den, rozdělené ve 2 denních dávkách (Consensus Statement on 21-Hydroxylase Deficiency, 2002). Zahajujeme i substitucí solí (NaCl) ve formě **solných kapslí** v dávce 1–3 g/den. Problémem včasného záchytu deficitu

21-hydroxylázy pomocí NS je fakt, že neznáme klinickou závažnost enzymatického deficitu, tedy zda je, či není přítomna klinicky významná solná porucha. V tomto směru nám hodně napoví výsledek molekulárněgenetické diagnostiky. Při genotypu korepondujícím s SW a SW/SV formou v substituci solí pokračujeme během kojeneckého věku, po prvním roce života se vysazuje.

V případě nejednoznačných nálezů je rozhodnutí o zahájení terapie před diagnostickým závěrem z výsledků ACTH stimulačního testu a molekulárněgenetické diagnostiky problematické, rozhodnutí závisí na konkrétní situaci (přítomnost klinických známek či dynamika screeningového a konfirmačního 17-OHP).

V případě potvrzení neklasické formy deficitu 21-hydroxylázy léčbu zahajujeme až později při objevení se klinických známek – předčasné pubarché, růstová akcelerace, akcelerace kostního věku. U této formy je léčba indikovaná pouze z hlediska hyperandrogenismu, sekreční kapacita kortizolu v ACTH stimulačním testu je normální (Trapp et al., 2012).

Samostatným problémem je úprava virilizovaného genitálu dívek, což vyžaduje úzkou spolupráci s dětským gynekologem a dětským chirurgem. Je nutný přesný popis morfologie genitálu včetně endoskopického vyšetření. Nižší stupně virilizace dívčího genitálu (hypertrofie klitoris, urogenitální sinus, mírná fúze labií) mohou být ponechány bez chirurgické úpravy. Vyšší stupně virilizace naopak vyžadují včasnou korekci. Takzvaná **feminizující genitoplastika** by měla být provedena nejlépe do konce prvního roku života, jednak je v kojeneckém věku technicky snazší a jednak se nenaruší sexuální sebeidentifikace dítěte počínající v batolecím věku. Obecně se preferují chirurgické postupy umožňující definitivní řešení již během jedné včasné operace, jindy se funkční korekce genitálu provádí až později, před dosažením reprodukčního věku (Lebl et al., 2016).

SLEDOVÁNÍ

U klasické formy deficitu 21-hydroxylázy je v novorozeneckém a kojeneckém věku důležité sledovat iontogram, frekvence kontrol závisí na dynamice natriemie a kalemie, většinou tyto hladiny kontrolujeme za 2, 4 a 8 týdnů od stanovení diagnózy, dále po 3 měsících. Po prvním roce života a stabilizaci natriemie a kalemie po vysazení substitute NaCl je dostačující kontrola jednou za 6 měsíců. O dostatečné supresi ACTH osy se přesvědčíme odběrem 17-OHP ráno v čase, kdy pacienti pravidelně užívají hydrokortizon, ale před jeho podáním. O potřebě mineralokortikoidní substitute se přesvědčíme stanovením ranní hodnoty PRA (před podáním fludrokortizonu). Dále je důležité monitorovat růst a růstovou rychlost každých 6 měsíců a od 2. roku věku pravidelně jednou ročně též kostní věk. Vzhledem k riziku předávkování fludrokortizonem je vhodná kontrola krevního tlaku.

LITERATURA

1. Consensus Statement on 21-Hydroxylase Deficiency from The Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and The European Society for Paediatric Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metabol* [online]. 2002; 87(9):4048-4053 [cit. 2017-04-30]. doi: 10.1210/jc.2002-020611. ISSN 0021-972x. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2002-020611>.
2. David J, Vinohradská H, Dejmeš P, Votava F. Epidemiologické hodnocení výsledků novorozeneckého screeningu kongenitální adrenální hyperplazie v České republice. XII. český pediatrický

sjezd s mezinárodní účastí, Hradec Králové, 15.–17. 9. 2016, Abstrakt in: *Čes-Slov Ped* 2016; 51(71): 42–43.

3. Falhammar H, Wedell A, Nordenström A. Biochemical and genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine* [online] 2015; 50(2): 306–314 [cit. 2017-03-29]. doi: 10.1007/s12020-015-0731-6. ISSN 1355-008x.
4. Krone, Nils a Wiebke ARLT. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2009, 23(2), 181–192 [cit. 2017-10-25]. DOI: 10.1016/j.beem.2008.10.014. ISSN 1521690x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521690X08001449>
5. Kliegman RM, et al. *Nelson textbook of pediatrics*. 19th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011. ISBN 9780808924203.
6. Lebl J. Malý atlas dětské endokrinologie. Praha: Galén, c2013. ISBN 978-80-7492-065-3.
7. Lebl J. *Klinická pediatrie*. Praha: Galén, 2012. ISBN 978-80-7262-772-1.
8. Lebl J, Al Tajj E, Koloušková S, Průhová Š, Šnajderová M, Šumník Z. *Dětská endokrinologie a diabetologie*. Praha: Galén, 2016. ISBN 978-80-7492-271-8.
9. Metodický návod k zajištění novorozeneckého laboratorního screeningu a následné péče. In: Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2016; 2016 (6).
10. Partsch CJ, Sippell WG, Mönig H. *Endokrinologische Funktionsdiagnostik*. 5., überarb. und erw. Aufl. Kiel: Schmidt und Klaunig, 2005. ISBN 3883121304.
11. Sarafoglou K, Hoffman G, Courtney H. *Pediatric endocrinology and inborn errors of metabolism*. New York: McGraw-Hill, 2008. ISBN 9780071439152.
12. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, et al. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metabol* [online] 2010; 95(9): 4133–4160 [cit. 2017-03-29]. doi: 10.1210/jc.2009-2631. ISSN 0021-972x.
13. Sperling M, et al. *Pediatric endocrinology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 2002. ISBN 9780721695396.
14. Trapp CM, Oberfield SE. Recommendations for treatment of nonclassic congenital adrenal hyperplasia (NCAH): An update. *Steroids* [online] 2012; 77(4): 342–346 [cit. 2017-06-26]. doi: 10.1016/j.steroids.2011.12.009. ISSN 0039128x.
15. Votava F, Novotná D, Kračmar P, et al. Lessons learned from 5 years of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in the Czech Republic: 17-hydroxyprogesterone, genotypes, and screening performance. doi: 10.1007/s00431-011-1656-6. ISBN 10.1007/s00431-011-1656-6.
16. Votava F, Kožich V, Chrástina P, Pešková K, Adam T, Friedecký D, Hlídková E, Vinohradská H, Dejmeš P, Krulišová V, Holubová A, Macek M Jr, David J, Gaillyová R, Valašková L. Performance metrics of 5 years of newborn screening in the Czech Republic. Poster. 9th ISNS International Meeting and 10th ISNS European Regional Meeting, September 11-14, 2016, The Hague, NL Abstract in: *Int J Neonatal Screen* 2016;(2): 5, 69.
17. Wedell A. Molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. *Pediatric Adrenal Diseases, Endocrine Development*, Karger, 2011, 20, 80-87.

MUDr. Jan David

*Klinika dětí a dorostu, 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze
Šrobárova 1150/50
100 34 Praha 10
e-mail: jan.david@fnkv.cz*