

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd**

Využití screeningových vyšetření v klinické praxi

bakalářská práce

Hradec Králové, 2008

Marcela Knirschová

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. RNDR. Vladimíru Semeckému, CSc.
a RNDR. Jaroslavu Louckému za vstřícný přístup a obětavou pomoc při vzniku
této práce.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

SOUHRN

Práce je přehledem o možnostech stanovení rizika nejčastějších vrozených vývojových vad plodu. Podává co možná nejobširnější informaci o tom, jaké výsledky lze od jednotlivých typů screeningu vrozených vývojových vad očekávat. Uvádí za jakých podmínek a jakým způsobem jsou screeningové testy prováděny. Dále porovnává jednotlivé typy testů vzhledem k počtu biochemických markerů a jejich kombinací. Pozornost je věnována i jejich vyhodnocení a statistickému zpracování. Z těchto porovnání můžeme odvodit, že nejefektivnějším a nejekonomičtějším screeningovým systémem VVV používaným v současné době je integrovaný test.

Klíčová slova: Screening, vrozené vývojové vady, biochemické markery, screeningové testy, Downův syndrom.

SUMMARY

This work gives an overview of the risk estimation of the most frequent birth defect. It describes what results we can expect from different types of the screening protocols. We compare those protocols, the way how they are proceed, number of used markers and we also focus on statistics. Comparing above mentioned facts, it is concluded, that the most safest, most economical and most efficient screening protocol is the integrated test.

Key words: Screening, Birth Defects, Biochemical Markers, Screening Tests, Down's Syndrome.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	6
1 CÍL STUDIE.....	7
2 ÚVOD.....	8
TEORETICKÁ ČÁST	9
3 CO JE TO SCREENING?	9
3.1 Kritéria pro efektivní a v praxi realizovatelný screening	9
3.2 Screeningové metody v perinatologii	10
3.3 Laboratorních screeningové metody v perinatologii	10
3.4 Specifika těhotenského screeningu	11
3.5 Důvody upřednostnění screeningu VVV před jejich diagnostikou	11
4 HISTORIE	11
4.1 Screening NTD	11
4.2 Screening Downova syndromu	12
PRAKTICKÁ ČÁST	13
5 PROVÁDĚNÍ SCREENINGU VVV V SOUČASNOSTI.....	13
6 SYNDROMOLOGIE.....	14
6.1 Defekt neurální trubice NTD	14
6.2 Rozštěp břišní stěny	15
6.3 Downův syndrom.....	15
6.4 Edwardsův syndrom	17
6.5 Smith – Lemli – Opitzův syndrom	18
6.6 Patauův syndrom.....	19
7 POŽADAVKY NA LABORATOŘ PROVÁDĚJÍCÍ SCREENING VVV	20
8 MOŽNOSTI VÝBĚRU TESTŮ A EFEKTIVITA JEDNOTLIVÝCH METOD ..	20
8.1 Ovlivnění účinnosti screeningu	22
8.2 Hodnocení testů	23
9 PROVÁDĚNÍ SCREENINGU V PRAXI.....	23
10 PROVÁDĚNÍ SCREENINGU V ZAHRANIČÍ	24
11 METODY STUDIE	25
11.1 Metody RIA (radioimunoanalýza).....	25
11.1.1 RIA na pevné fázi	25
11.2 Metoda IRMA (imunoradiometrická analýza)	26
11.3 Vícetedektorový gama – čítač pro RIA JNG 403	26
12 PRINCIPY JEDNOTLIVÝCH METOD.....	26
12.1 PAPP-A (pregnancy associated plazma protein A)	26
12.2 AFP (α -1-fetoprotein)	27
12.3 F- β -HCG (volná β podjednotka HCG).....	28
12.4 T – HCG (lidský choriogonadotropin).....	29
12.5 UE3 (unkonjugovaný estriol).....	29
13 POROVNÁNÍ RŮZNÝCH DRUHŮ TESTŮ.....	30
13.1 Porovnání rizika DS u triple testu a u integrovaného testu.....	32
13.2 Porovnání rizika NTD u triple testu a integrovaného testu	33
14 VÝSLEDKY STUDIE.....	33
Seznam obrázků.....	35
Seznam tabulek	36
Seznam literatury	37

SEZNAM ZKRATEK

AC	amniocentéza
AF AFP	α -1-fetoprotein (AFP v plodové vodě)
AFP	α -1-fetoprotein
Agn	antigen
CVS	biopsie choria
DR	Detection Rate – senzitivita
DS	Downův syndrom
EQC	externí kontrola kvality
F- β -HCG	volná β podjednotka choriového gonadotropinu
FPR	False Positivity Rate – falešná pozitivita
GDM	gestační diabetes mellitus
HbsAg	povrchový antigen viru hepatitidy
HCG	lidský choriogonadotropin
HIV	virus získané imunodeficience
IQC	interní kontrola kvality
IRMA	imunoradiometrická analýza
KO	krevní obraz
MS AFP	α -1-fetoprotein (sérový AFP)
NT	šijové projasnění
NTD	defekt neurální trubice
OGTT	orální glukosový toleranční test
PAPP-A	pregnancy associated plazma protein A
PI	protilátka
RIA	radioimunoanalýza
SCR	screening
SLOS	Smith – Lemli – Opitzův syndrom
UE3	nekonjugovaný estriol
UZ	ultrazvuk
VVV	vrozené vývojové vady

1 CÍL STUDIE

Možnosti stanovení rizika VVV plodu jsou stále na vyšší úrovni a celý systém screeningu se neustále zdokonaluje.

Cílem studie bylo shromáždit aktuální informace o současných možnostech screeningu vrozených vývojových vad a provést srovnání se zahraniční praxí včetně nahlédnutí do historie.

Zároveň jsem se pomocí statistického porovnání dat získaných při provádění screeningu VVV v laboratoři IMALAB s.r.o. snažila najít nejefektivnější screeningový systém VVV.

2 ÚVOD

Jako téma mojí bakalářské práce jsem si vybrala využití screeningových vyšetření v klinické praxi. Zaměřila jsem se především na screening VVV(vrozených vývojových vad) a to z následujících důvodů:

- je to téma, které se dotýká velké části populace
- dlouhodobě je prováděn v laboratoři, ve které pracuji
- mám dobrý přístup k informacím týkajících se tohoto tématu

Na screening VVV lze nahlížet z různého pohledu :

- od nastávající matky
- od ošetřujícího gynekologa
- z genetického pracoviště
- z klinické laboratoře

Jejich společným cílem je získat co nejpresnější a nejčasnější informace o zdraví plodu a učinit tak způsobem co nejméně zatěžujícím organismus matky i očekávaného potomka.

V tomto případě je dobrá informovanost všech zúčastněných o možnostech screeningu základním předpokladem k získání co nejvyšší kvality výsledků.

Moje práce se skládá ze dvou částí - teoretické a praktické.

V teoretické části jsem se pokusila podat ucelený pohled na tuto problematiku. Je přehledem současných možností screeningu vrozených vývojových vad.

V praktické části provádím srovnání jednotlivých druhů screeningových testů používaných v laboratorní praxi.

TEORETICKÁ ČÁST

3 CO JE TO SCREENING?

Screeningové vyšetření je vyhledávací test, který slouží k identifikaci rizikové skupiny jedinců, u kterých je pravděpodobnost výskytu určitého onemocnění či abnormality významně vyšší než v běžné populaci. Smyslem screeningu je aby nebyla prováděna další vyšetření nebo přímo diagnostické testy u osob u nichž k tomu neexistují žádné medicínské důvody.(1)

3.1 Kritéria pro efektivní a v praxi realizovatelný screening

- 1) Vyhledávaná choroba musí být jasně definována a mít i významnou incidenci (výskyt v populaci).
- 2) Jedná se o medicínsky závažné onemocnění, pro které existuje efektivní způsob léčby nebo medicínský zásah.
- 3) Jednoduchost a snadná proveditelnost.
- 4) Neinvazivnost a bezpečnost pro pacienta.
- 5) Efektivnost z hlediska nákladů – náklady na screening musí být nižší než náklady na léčení vyhledávané choroby v populaci.
- 6) Vysoká senzivita (% správně pozitivních výsledků z daného souboru).
- 7) Vysoká specificita (% správně negativních výsledků z daného souboru).
- 8) Maximální možná pozitivní prediktivní hodnota (udává % s jakou pravděpodobností bude mít pacient hledanou chorobu, když bude výsledek testu pozitivní).
- 9) Maximální možná negativní prediktivní hodnota (udává % s jakou pravděpodobností nebude mít pacient danou chorobu, když výsledek testu bude negativní).

- 10) Možnost testovat jeho spolehlivost (kontrola kvality).
- 11) Rovnocenný přístup – pacienti mají mít právo na rovnocenný přístup ke screeningu.
- 12) Charakter testu – distribuce hodnot u postižených a nepostižených jedinců musí být známy, překryv hodnot musí být dostatečně nízký a musí být definován cut – off. (1,2)

V dnešní době je v mnoha medicínských oborech role screeningu nezastupitelná. Mezi ně patří i perinatologie .

3.2 Screeningové metody v perinatologii

- ultrazvukový screening k objektivizaci gestačního stáří
- screening těhotenských abnormalit
- ultrazvuk kongenitálních malformací plodu
- screening chromozomálních a genetických odchylek
- screening fetálního krevního oběhu a chování plodu
- screening příznaků předčasného porodu
- screening infekčních a interních onemocnění matky (2)

3.3 Laboratorních screeningové metody v perinatologii

- stanovení biochemických markerů VVV (vrozených vývojových vad)
- chemické vyšetření moče (GDM, infekce, preeklampsie)
- OGTT (GDM)
- KO (anemie, trombocytopenie)
- serologické vyšetření (HIV, HbsAg, lues)
- krevní skupina + RH faktor (hlavně u RH negativní matky) (2)

3.4 Specifika těhotenského screeningu

- ve zvýšené míře dbáme na neinvazivnost a nebolestivost vyšetření
- nutná maximální možná bezpečnost pro matku i plod
- přestože jsme schopni odhalit hledaný patologický stav – možnosti efektivní léčby bývají omezené, z toho plyne vznik velkého traumatu pro matku
- velmi důležitý je srozumitelný a citlivý přístup lékaře při vysvětlení výsledků testu pacientce a podání vyčerpávajících informací o možném dalším postupu

3.5 Důvody upřednostnění screeningu VVV před jejich diagnostikou

- všechny metody diagnostiky VVV jsou invazivní (amniocentéza, biopsie choria, kordocentéza) a jsou spojeny se zvýšeným rizikem potratu (0,5 – 1 %) a různých komplikací pro matku i plod
- nezanedbatelná je i daleko vyšší cena invazivního a zejména následného laboratorního cytogenetického nebo molekulárně genetického vyšetření

4 HISTORIE

4.1 Screening NTD

1956 - popsán AFP

1974 - souvislost vyšších hodnot AFP v mateřském séru při NTD

1977 - AFP jako marker pro sérový screening v rutinní praxi

4.2 Screening Downova syndromu

- využití věku matky

1933 - souvislost vyššího mateřského věku se syndromem Down

70.léta - screening prováděn u žen nad 35 let věku – amniocentéza nabízena starším matkám

- využití sérových markerů ve 2.trimestru

1984 - souvislost sníženého AFP a DS

1987 - souvislost vyššího HCG a DS

1988 souvislost sníženého UE3 a DS

1988 - zavedení TRIPLE TESTU do praxe

- využití sérových markerů + měření NT v 1.trimestru

1985 - u plodu s DS je na UZ vyšší NT (šíjové projasnění)

1990 – souvislost vyššího NT s dalšími aneuploidiiemi

1991 - souvislost snížení hladiny PAPP-A u plodu s DS

1992 - F- β -HCG jako marker DS v1.trimestru

1992 - UZ měření NT jako screeningová metoda

1996 -kombinace UZ a bioch. markerů v 1.trimestru

-společné využití markerů 1. a 2.trimestru

1999 – kombinace UZ a biochemických markerů v 1. a 2.trimestru – spojení do podoby integrovaného testu (3)

PRAKTICKÁ ČÁST

5 PROVÁDĚNÍ SCREENINGU VVV V SOUČASNOSTI

V současné době se screening VVV provádí ve dvou obdobích

- v 1. trimestru (11.-14.týden gravidity)
- v 2. trimestru (15 –20.týden gravidity)

Screening VVV v 1. trimestru pomocí měření NT (šijového projasnění) a biochemických markerů (PAPP-A, f- beta HCG) je zaměřen zejména na zjištění rizika vzniku:

- chromozomálních aberací
- trizomie 21.chromozomu (Downův syndrom)
- trizomie 18. chromozomu (Edvarsův syndrom)
- morfologické vady
- riziko vrozených vad srdce (za předpokladu špičkové ultrazvukové techniky a v závislosti na tělesné konstituci pacientky)
- porodnických komplikací
- hrozící potrat

Screening VVV ve 2. trimestru pomocí biochemických markerů (AFP , HCG , UE3) je zaměřen na zjištění rizika:

- defektů kožního krytu plodu (NTD , rozštěpy břišní stěny)
- chromozomálních aberací plodu, stejných jako u 1. trimestru
- trizomie 21.chromozomu (Downův syndrom)
- trizomie 18. chromozomu (Edvarsův syndrom)
- trizomie 13. chromozomu (Pataův syndrom)
- Smith – Lemli – Opitzův syndrom (2)

6 SYNDROMOLOGIE

Zabývá se vrozenými vadami a jejich kombinacemi. Vrozenými vadami nejčastěji označujeme poruchy utváření orgánů, které vznikly v období nitroděložního života.

Do kategorie vrozených vad však náleží i poruchy funkční (mentální retardace) a také poruchy na úrovni molekulární (vady metabolismu).

Vrozené vady mohou mít primárně genetické příčiny nebo naopak mohou být výsledkem pouze nepříznivého vlivu zevního prostředí.

Většina vrozených vad je multifaktoriálních.

V genetice stanovujeme často diagnózu a prognózu na základě zjevných odchylek od normy - stigmat, aniž je známa etiologie postižení.(4)

6.1 Defekt neurální trubice NTD

Je porucha uzávěru nervové trubice, která vzniká nedokonalým uzávěrem páteřního kanálu v časných fázích vývoje embrya. Může být v kterémkoliv místě páteře nejčastěji v oblasti bederní. 80% postižených, kteří přežijí mají výrazné neurogenní postižení (paraplegie, inkontinence, 20% je postiženo mentálně).

Pokud defekt postihne hlavovou část vzniká tzv.anencefalus (téměř úplné chybění mozku a lebního krytu). Anencefalie tvoří jednu polovinu NTD a je inkompatibilní s přežitím.

Nejvyšší riziko NTD mají plody matek nejmladších a nejstarších věkových skupin. V 95% případů se rodí postižený plod jako 1.v pořadí. Riziko zvyšují některé léky u matky (antiepileptika), naopak podávání kyseliny listové nejméně dva měsíce před otěhotněním riziko výskytu NTD snižuje. (2,5)

6.2 Rozštěp břišní stěny

Existují dva typy defektů:

První je omfalokela (pupeční kýla) - břišní orgány nejsou umístěny správně v dutině břišní, ale zůstávají ve vaku v místě úponu pupečníku.

Druhým typem je gastroschiza – vzniká vytvořením štěrbin v již vytvořené břišní stěně, kterou mohou vyhrěznout břišní orgány.

U obou vad může být řada přidružených komplikací a anomálií.(5)

Screeningovým markerem pro defekty kožního krytí je mateřský sérový AFP (MS-AFP). Obecně platí, že riziko postižení stoupá s hodnotou MS-AFP, který je pravděpodobně placentárního původu.

Zvýšené AFP nacházíme i v plodové vodě (AF-AFP) a je způsobeno prosakováním AFP z defektu kůže plodu do plodové vody.

Další nalezení zvýšených hodnot AFP může souviset s provedením předchozího invazivního vyšetření, nebo také s odumřením plodu. Fyziologické zvýšení koncentrace v séru můžeme pozorovat u vícečetných těhotenství. (2)

6.3 Downův syndrom

Základní genetická výbava člověka je v každé buňce tvořena 46 chromozomy. Jakákoliv změna, chybění, ale i zmnožení chromozomů se projeví jako vrozené postižení. Downův syndrom vzniká jako následek přítomnosti nadbytečného chromozomu číslo 21. Postižený má tedy 47 chromozomů.

Charakteristické symptomy u postižených DS:

- typický obličej – šikmé oči
- kožní řasa – epicantus
- menší lebka
- kožní řasa na zátylku
- krátký krk
- široký kořen nosu
- malá ústa
- větší jazyk
- malé nízko posazené uši

- krátké prsty
- opičí rýha
- menší zavalitá postava
- výška v dospělosti 144-155cm
- IQ 25-50
- jedna třetina dětí se rodí se srdeční vadou

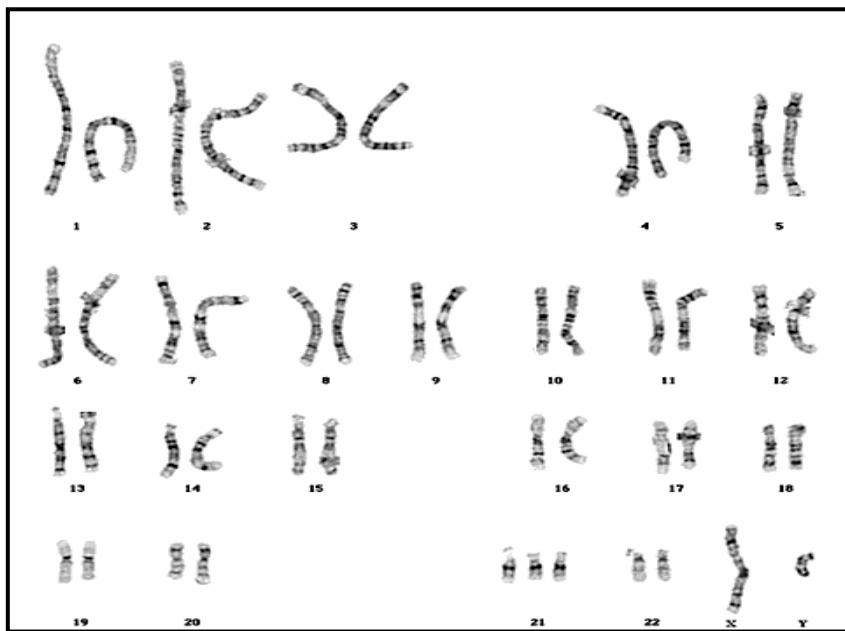
Vznik Downova syndromu se nedá ničím ovlivnit. Riziko stoupá s věkem těhotné matky.

Riziko u normální populace je 1:800

u 35 leté ženy je	1:380
u 40 leté ženy je	1:110
u 45 leté ženy je	1:40

Proto se u žen nad 35 let donedávna nabízel odběr plodové vody (amniocentéza). Nejnovější doporučení již nebere věkové riziko samostatně do úvahy a mělo by se vycházet z konkrétních výsledků screeningu. V případě invazivních vyšetření se diagnóza blíží 100%, ale je spojena s jistým rizikem poškození plodu. (6)

U Downova syndromu bývá u kombinovaného testu v prvním trimestru snížena hladina PAPP-A, zvýšené F- β -HCG a dále zvětšení šířky NT oproti normálu, které může signalizovat i jiné vady, zejména srdeční. U triple testů nacházíme snížení hladiny AFP a UE3, zvýšenou hladinu HCG



Obrázek 1: 47, XY, +21

Na obrázku 1 na straně 17 vidíme trisomii 21. chromosomu u jedince mužského pohlaví (chromosomy XY), vyskytující se u Downova syndromu. (4)

6.4 Edwardsův syndrom

Zde je přítomna trisomie 18. chromozomu.

Polovina plodů zemře v děloze, 50% do dvou měsíců po narození.

Jen 5-10% přežije 1rok.

Charakteristické symptomy u postižených Edwardsovým syndromem:

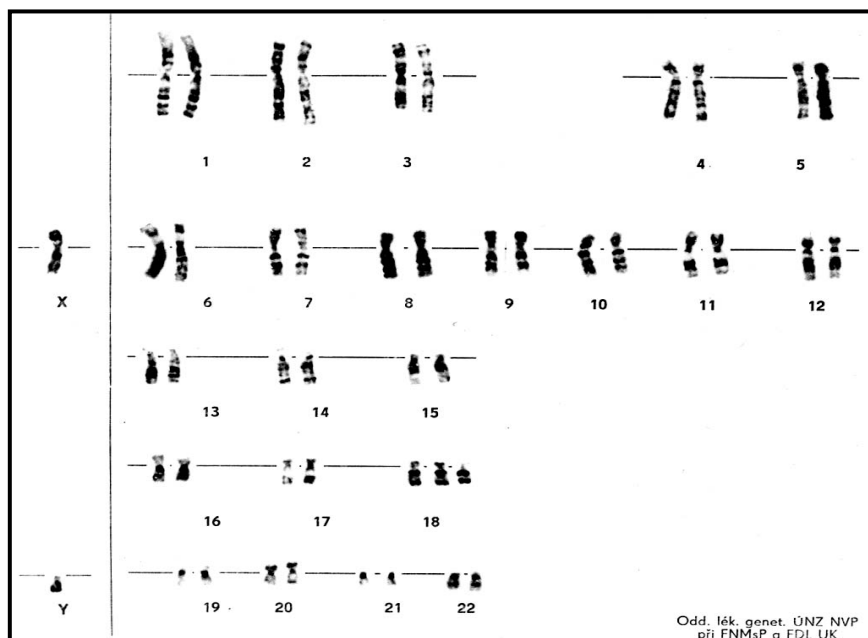
- nízká porodní váha
- abnormální tvar hlavy
- malá čelist
- nízko posazené uši
- sevřená pěst s překříženými prsty
- srdeční vady
- obrácený nos
- obtížné dýchání

- nevyvinuté nebo chybějící palce
- opožděný růst

Výskyt 1:3500 novorozenců. (7)

U kombinovaného testu jsou oba biochemické markery PAPP-A, F-β-HCG výrazně sniženy a hodnota NT (nuchální translucence) výrazně zvýšena.

Ve 2. trimestru bývá snižena hladina AFP, HCG i UE3.



Obrázek 2: 47, XY, +18

Na obrázku 2 na straně 18 je jasně patrná trisomie 18. chromosomu u jedince mužského pohlaví (chromozomy XY), vyskytující se u Edvarsova syndromu. (4)

6.5 Smith – Lemli – Opitzův syndrom

Jedná se o autosomálně recesivní dědičné onemocnění.

Doprovodná metabolická abnormalita – snižená hladina plazmatického cholesterolu a zvýšená 7 – dehydrosterolu při plazmatickém defektu

7 – dehydrosterol - reductázy. Cholesterol je normálně součástí buněčných membrán a je nezbytný pro normální funkci organismu.

Charakteristické symptomy u postižených SLOS:

- mikrocefalie
- ptóza víček
- malý vpáčený nos
- mikrognacie
- malý vzrůst
- mentální retardace
- skeletární abnormality
- často syndaktylie
- polydaktylie na nohách
- u mužů hypogenitalismus různého stupně

Projevuje se velmi nízkou hladinou UE3.

Výskyt v populaci 1:40 000. (4)

6.6 Pataův syndrom

Nemoc je způsobena nadpočetným 13. chromozomem.

Zde se projevují vrozené vady mozku, mikrocefalie, vady očí a ušních boltců, rozštěp rtů a patra, polydaktylie, těžká psychomotorická retardace, anomálie urogenitálního ústrojí.

Těhotenství často končí samovolným potratem nebo předčasným porodem. Více než 90% dětí umírá do jednoho roku.

Výskyt v populaci 1:5000.

Při odhalování tohoto syndromu se uplatňují zejména specifické UZ markery. (8)

7 POŽADAVKY NA LABORATOŘ PROVÁDĚJÍCÍ SCREENING VVV

- dostatečný počet vyšetření VVV v imunoanalytické laboratoři (minimálně 1000/rok) – platí pro první i druhý trimestr.
- externí i interní hodnota kvality laboratoře a průběžné monitorování výsledků.
- doporučený systém EHK
 1. trimestr – UK NEQUAS (Německá společnost pro klinické laboratoře)
 2. trimestr – SEKK(systém externí kontroly kvality),
DGKL (Společnost pro kontrolu kvality v klinických laboratořích ve Velké Británii)
- musí být přítomen pracovník s odpovídajícím vzděláním zodpovědný za provádění screeningu a systém EQC a IQC (interní a externí kontrola kvality).
- laboratoř má přesně vypracovaný postup pro preanalytickou fázi
- analytické požadavky jsou přesně definovány a dodržovány
- laboratoř musí spolupracovat s ošetřujícím gynekologem a genetickým pracovištěm, které provádí konečné vyhodnocení screeningu
- laboratoř má provedenou validaci metod a stanovenou rozšířenou nejistotu měření. (2)

8 MOŽNOSTI VÝBĚRU TESTŮ A EFEKTIVITA JEDNOTLIVÝCH METOD

- 1) Kombinovaný test
 - 1 trimestr (11 – 14 týden)
 - PAPP – A , F – beta HCG, měření NT (šijové projasnění) event. další ultrazvukové markery

Tento test je v současnosti zřejmě nejefektivnějším samostatným screeningovým systémem se záchytem téměř 85 % postižených plodů při 5 % falešné pozitivitě. Při zvýšení senzitivity na 90% se neúměrně zvýší falešná pozitivita (> 10%). Nevýhodou je při pozitivním výsledku obtížnější cytogenetická analýza materiálu získaného CVS. Jeho velkou výhodou je včasnější výsledek.

2) Triple test

- 2. trimestr (15 – 20 týden)
- AFP, HCG, UE3

Pokud je použito i měření NT je senzitivita okolo 82 %, ale většinou se samostatné NT s triple testem neintegruje.

V některých laboratořích se stanovuje navíc jako marker i INHIBIN A. Takto prováděný test je označován jako kvadruple test.

INHIBIN A není v sazebníku výkonů hrazených zdravotními pojišťovnami, proto se v České republice používá velmi zřídka.

3) Integrovaný test = kombinovaný test + triple test

- výsledek po 2. trimestru

Spojení těchto dvou systémů může přinést zvýšení senzitivity na >94 % při snížení FPR na 3-4%

4) Sekvenční test - forma integrovaného testu se zohledněním výsledku se zvýšeným rizikem v 1. trimestru.

Výsledek po 1. trimestru zasíláme lékaři jen tehdy pokud vyjde zvýšené riziko VVV u kombinovaného testu – následuje podrobnější ultrazvukové vyšetření popřípadě CVS (biopsie choria). Jinak jsou výsledky hodnoceny společně s triple testem a odesílány po provedení druhotrimestrální části testu ošetřujícímu lékaři. U pozitivního výsledku je ženě doporučena konzultace v centru prenatální diagnostiky, popřípadě amniocentéza. V případě negativního výsledku můžeme s vysokou pravděpodobností určit, že se dítě narodí bez sledovaných VVV. (3)

8.1 Ovlivnění účinnosti screeningu

- kombinace markerů i jejich počet
- způsob jakým jsou markery kombinovány
- volba cut – off
- nastavením číselné hodnoty cut - off si můžeme modifikovat efektivitu screeningu i jeho senzitivitu a falešnou pozitivitu

Hodnocení screeningu VVV je závislé na délce gestačního stáří v těhotenství. Nejkorektnějším způsobem datace délky těhotenství je ultrazvukové vyšetření.

Z pohledu vyhodnocení rizika přítomných VVV hraje roli také hmotnost těhotné. Výsledné riziko může být teoreticky i prakticky ovlivněno i dalšími faktory jako je například: kouření těhotné, diabetes mellitus a další. V praxi se ovšem tyto parametry při vyhodnocování screeningu využívají jen zřídka.

Hodnocení u vícečetných těhotenství je možno také provádět, ale výsledná hodnota rizika není statisticky tak významná jako u jednočetných těhotenství.

V následujících tabulkách 1 a 2 na straně 22 je provedeno porovnání screeningových postupů u kombinovaného a sekvenčního testu.

Tabulka 1: Hodnota senzitivity při fixované falešné pozitivitě

FPR %	1	3	5
DR% – kombinovaný test	69	79	85
DR% – sekvenční test	81	89	91

DR - senzitivita

FPR - falešná pozitivita (1)

Tabulka 2: Hodnota falešné positivity při fixaci senzitivity

DR%	70	80	90
FPR% - kombinovaný test	1,1	3,4	11
FPR% - sekvenční test	< 0,5	0,9	3,8

DR - senzitivita

FPR - falešná pozitivita (1)

8.2 Hodnocení testů

Z pohledu těchto informací se sekvenční test jeví jako nejefektivnější způsob screeningu VVV, protože sdružuje výhody screeningu prvního i druhého trimestru. Kombinovaný test má lepší výsledky než triple test, ale horší než integrovaný test .

Samostatně posuzovaný triple test se jeví jako překonaný. Jeho provádění v budoucnu má však hned několik důvodů.

- 1) Určité procento žen přichází ke gynekologovi v pokročilejším stádiu těhotenství a načasné vyšetření biochemických markerů ke kombinovanému testu (PAPP-A a F- β -HCG) je už pozdě.
- 2) Součástí triple testu je také stanovení AFP, který je jediným biochemickým markerem defektu neurální trubice (NTD).
- 3) Problémem u kombinovaného testu zůstává i měření NT(šíjového projasnění), protože ne všude je dostupný kvalitní ultrazvukový přístroj a zároveň i vyškolený specialista s certifikátem.
- 4) Hlavním důvodem zachování druhotrimestrálního triple testu je jeho začlenění do integrovaného testu. (10)

9 PROVÁDĚNÍ SCREENINGU V PRAXI

- zjištění těhotenství
- návštěva gynekologa a určení přesné délky těhotenství
- nabídnutí screeningu ženě (test je dobrovolný) a podrobné poučení o jeho významu a možnostech
- v 10 – 11. týdnu (první trimestr) odběr krve ke kombinovanému testu
- vyšetřuje se PAPP- A a volná podjednotka HCG - F- β -HCG

- mezi 11 – 13. týdnem – měření tloušťky šíjového projasnění
- určení výsledků kombinovaného testu
- pozitivní výsledek se odesílá lékaři těhotné a ten jí vysvětlí další postup – možnosti diagnostiky pomocí CVS
- negativní výsledek se nadále ponechává v laboratoři a je použit k vyhodnocení integrovaného testu – v 16. – 17 týdnu odběr krve na triple test
- vyšetřuje se hladina AFP, HCG, UE3
- vyhodnocení výsledku integrovaného testu (kombinovaný + triple test) systémem ALPHA
- v případě pozitivního výsledku je další postup konzultován s ošetřujícím lékařem
- v případě negativního výsledku vzhledem k vysoké senzitivitě u tohoto typu screeningu můžeme říci, že s velkou pravděpodobností nepromeškáme reálně přítomnou vadu plodu. Tento screeningový model zároveň disponuje velmi nízkou falešnou pozitivitou a z toho plynoucím velmi malým procento zbytečně provedených invazivních výkonů, které znamenají velmi stresující situaci pro ženu. (9,10)

10 PROVÁDĚNÍ SCREENINGU V ZAHRANIČÍ

Provádění screeningových metod tohoto typu v zahraničí je závislé jednak na přístupu plátců zdravotní péče a jednak na technických a personálních možnostech v dané zemi. V západní Evropě je screening prováděn podobným způsobem jako v ČR. Ženy se mohou rozhodnout zda preferují časnější screening s nižší senzitivitou nebo naopak plnohodnotný screening v obou trimestrech. Na rozdíl od ČR se v západní Evropě poměrně často provádí ve 2. trimestru ještě další biochemické stanovení – INHIBIN-A. Podobným způsobem se také screening provádí v Severní Americe. V méně rozvinutých zemích má provádění těchto vyšetření různou úroveň. V některých regionech je

prováděn téměř na úrovni současných standardů a v jiných není prováděn vůbec. (10)

11 METODY STUDIE

Ke stanovení biochemických markerů v naší laboratoři používáme izotopové imunochemické metody – radioimunoanalýzu (RIA) a imunometrickou analýzu (IRMA). Metody RIA pracují s antigenem značeným radioizotopem a metody IRMA se značenou protilátkou. Ke značení antigenu se obvykle používá radioaktivní izotop jodu I^{125} . (12)

11.1 Metody RIA (radioimunoanalýza)

Patří do skupiny kompetitivních (soutěživých) metod s heterogenním uspořádáním. Pracuje se se třemi reaktanty. Jsou to Agn, Agn^x a Ab přidaná v limitovaném množství. U klasické RIA je Ab v tekutém stavu na rozdíl od RIA techniky na pevné fázi, kde je Ab v limitovaném množství vázána na pevnou fázi. U našich měření používáme techniku pevné fáze. (12)

11.1.1 RIA na pevné fázi

U techniky pevné fáze může být protilátka v limitovaném množství navázána na vnitřní stěnu zkumavek z polystyrénu, polypropylenu, nebo polytetrafluoretylenu. Stěny reakčních zkumavek jsou potaženy protilátkou, na kterou se kompetitivně (soutěživě) naváže značený i neznačený antigen. Po ukončení reakce se roztok s nezreagovaným Agn a Agn^x odsaje a po vypláchnutí stěn zkumavky se měří radioaktivita imunokomplexu Agn^x – Ab – pevná fáze. (12)

Metodu RIA používáme u HCG a UE3.

11.2 Metoda IRMA (imunoradiometrická analýza)

Jde o nekompetitivní (nesoutěživou) metodu, při které se používají tři reaktanty – stanovovaný Agn, Ab – navázaná v přebytku na pevnou fázi a značená Ab^x přidávaná v nadbytku. Na protilátku, kterou je nasycená pevná fáze (stěna zkumavky) se naváže stanovovaný Agn. Po inkubaci a promytí se na jiné vazebné místo antigenu naváže v nadbytku přidaná značená Ab^x a znovu se provede inkubace. Volná nezreagovaná Ab^x se odstraní promytím. Měří se radioaktivita značeného imunokomplexu vázaného na pevné fázi.

Metodu IRMA používáme u PAPP-A, AFP a F – β –HCG. (12)

U obou metod provádíme měření radioaktivity na detektoru gama záření.

11.3 Vícedetektorový gama – čítač pro RIA JNG 403

Je to přístroj umožňující registrovat současně vícerymi detektory četnost impulsů, úměrných aktivitám vzorků značených nízkoenergetickými gama nuklidy (u nás I¹²⁵). Jako detektory záření jsou použité krystaly NaI spojené s fotonásobiči, do kterých se vkládají vzorky ve zkumavkách z plastu, umístěné v ochranné kazetě. Naměřené četnosti impulsů s korekcí na hodnotu pozadí se dále vyhodnocují vhodným programem na připojeném externím počítači. (13)

12 PRINCIPY JEDNOTLIVÝCH METOD

12.1 PAPP-A (pregnancy associated plazma protein A)

Je to lidský těhotenský glykoproteid, který je proteázou IGFBP-4. Jeho funkce v graviditě není známa. Výsledky stanovení koncentrace PAPP-A lze použít pro odhad rizika výskytu Downova syndromu v prenatálním screeningu .

Materiál k analýze : sérum

Odběr :3 – 5 ml srážlivé krve do skla nebo plastu bez úpravy.

Referenční hodnoty: výsledky jsou interpretovány na základě gestačního stáří a dávají se do souvislosti s F – β –HCG a měřením NT popřípadě jinými biochemickými markery. (14)

Princip metody

Jedná se o imunoradiometrické stanovení (IRMA), které je založeno na metodě typu „sandwich“. K soupravě jsou použity dvě monoklonální protilátky, proti dvěma různým epitopům molekuly PAPP- A, které si vzájemně nekonkurují. Vzorky nebo kalibrátory se inkubují ve zkumavkách potažených první monoklonální protilátkou společně z roztokem druhé monoklonální protilátky značené I¹²⁵. Po inkubaci se obsah zkumavek odsaje a zkumavky se promyjí, aby se odstranila nenačnaná značená protilátka. Pomocí gama-čítače se odečtou hodnoty impulsů. Koncentrace PAPP-A ve vzorcích se vypočítá z kalibrační křivky sestavené pomocí kalibrátorů. Koncentrace je přímo úměrná naměřené radioaktivitě. (15)

12.2 AFP (α -1-fetoprotein)

Je důležitý sérový onkofetální glykoprotein časného vývoje savců a zároveň jeden z významných tumorových markerů.(primární karcinom jaterních buněk, nádory varlat a karcinom GITT).

Materiál k analýze : sérum

Odběr 3-5 ml srážlivé krve do skla nebo plastu bez úpravy.

Referenční hodnoty: Pro VVV jsou výsledky interpretovány na základě gestačního stáří a dávají se do souvislosti s ostatními biochemickými markery. Samostatné zvýšené AFP může signalizovat NTD nebo rozštěpy břišní stěny. Zvýšení hladiny může být způsobeno alkoholismem. (14)

Princip metody

Jedná se o radioimunometrické stanovení (IRMA), které probíhá ve dvou krocích v soupravě jsou použity myší monoklonální protilátky proti 2 různým epitopům molekuly AFP. Nejprve se ve zkumavkách potažených 1. monoklonální protilátkou inkubují vzorky nebo kalibrátory. Po inkubaci se obsah odsaje a promyje. Napipetuje se do nich 2. protilátka značená I^{125} . Po 2. inkubaci se odsaje obsah zkumavek a vymyje nenavázaná značená protilátka. Vázaná aktivita se měří na gama čítači. Koncentrace AFP v kalibrátorech a vzorcích je přímo úměrná změřené radioaktivitě. (16)

12.3 F- β -HCG (volná β podjednotka HCG)

Molekula lidského placentárního glykoproteinu HCG má 2 podjednotky α a β . β podjednotka určuje biologickou specifitu hormonu. V tělních tekutinách může být přítomna jak intaktní molekula HCG i volné podjednotky. Jeho využití je hlavně ve sledování suspektní gravidity, ve screeningu VVV a zároveň má funkci tumorového markeru (testikulární, placentární a trofoblastické nádory.)

Materiál k analýze: sérum

Odběr: 3 – 5 ml venózní krve do skla nebo plastu bez úpravy. Hemolytické, lipemické a ikterické vzorky není možno zpracovat. Nevhodné je i dlouhé stání při laboratorní teplotě, které zvyšuje podíl F- β -HCG ve vzorku. (14)

Princip metody

Stanovení F- β -HCG se provádí metodou IRMA a je založeno na dvoukrokové metodě typu „sandwich“. Systém používá 2 myší monoklonální protilátky proti 2 různým epitopům přístupným pouze na volné β podjednotce HCG, které si vzájemně nekonkurují. Nejprve se ve zkumavkách potažených první protilátkou inkubuje vzorek nebo kalibrátor spolu s fosfátovým pufrům. Dále se obsah zkumavek odsaje a napipetuje se protilátka značená I^{125} a inkubuje se. Následně se obsah zkumavek odsaje a vymyje se nenavázaná značená protilátka. Vázaná aktivita I^{125} se měří na gama – čítači. Sestrojí se

kalibrační křivka a z té se odečtou hodnoty F-β-HCG. Koncentrace ve vzorcích je přímo úměrná měřené radioaktivitě. (17)

12.4 T – HCG (lidský choriogonadotropin)

Je choriogonadotropní hormon placentárního původu, který může být též tvořen buňkami trofoblastického nádoru. Stanovení je součástí prenatálního screeningu (společně s AFP a UE3). Dále má význam jako tumorový marker a je vhodný i ke sledování suspektní gravidity.

Materiál k analýze: sérum

Odběr: 3 – 5 ml srážlivé krve do skla

Referenční hodnoty: pro účely VVV úměrné gestačnímu stáří (14)

Princip metody

Radioimunoanalytické stanovení (RIA) HCG je kompetitivní (soutěživá) metoda. Vzorek nebo kalibrátor se inkubuje ve skumavkách potažených protilátkou společně s I^{125} – HCG jako radioindikátorem. Po inkubaci se obsah odsaje a navázaná aktivita se měří gama – čítačem. Sestrojí se kalibrační křivka a z ní se odečtou koncentrace HCG v neznámých vzorcích. (18)

12.5 UE3 (unkonjugovaný estriol)

Tento hormon je během těhotenství produkován placentou, játry a nadledvinkami plodu a je využíván společně s HCG a AFP k účelům biochemické prenatální diagnostiky.

Materiál k analýze: sérum

Odběr: 3-5 ml srážlivé krve do skla nebo plastu bez úpravy.

Referenční rozmezí: hodnocení UE3 jako součást prenatálního screeningu je závislé na gestačním stáří probíhajícího těhotenství. (14)

Princip metody

RIA stanovení UE3 je kompetitivní (soutěživá) metoda vzorek nebo kalibrátor se inkubuje ve zkumavkách potažených protilátkou společně s I^{125} - estriolem jako radioindikátorem. Po inkubaci se obsah zkumavek a navázaná aktivita se měří gamačítačem. Sestrojí se kalibrační křivka a z ní se odečtou koncentrace estriolu v neznámých vzorcích. (19)

13 POROVNÁNÍ RŮZNÝCH DRUHŮ TESTŮ

Laboratoř IMALAB s.r.o. ve Zlíně, ve které pracuji se zabývá screeningem VVV 13 let.

Od roku 1995 provádí screening VVV pomocí triple testu.

Od roku 2001 také pomocí prvotrimestrálního kombinovaného testu.

Od 1.1.2008 se používá k vyhodnocení markerů modifikovaný integrovaný test, který je označován jako sekvenční.

Všechny druhy uvedených testů jsou používány souběžně. (11)

Pro koho mohou být různé druhy testů určeny?

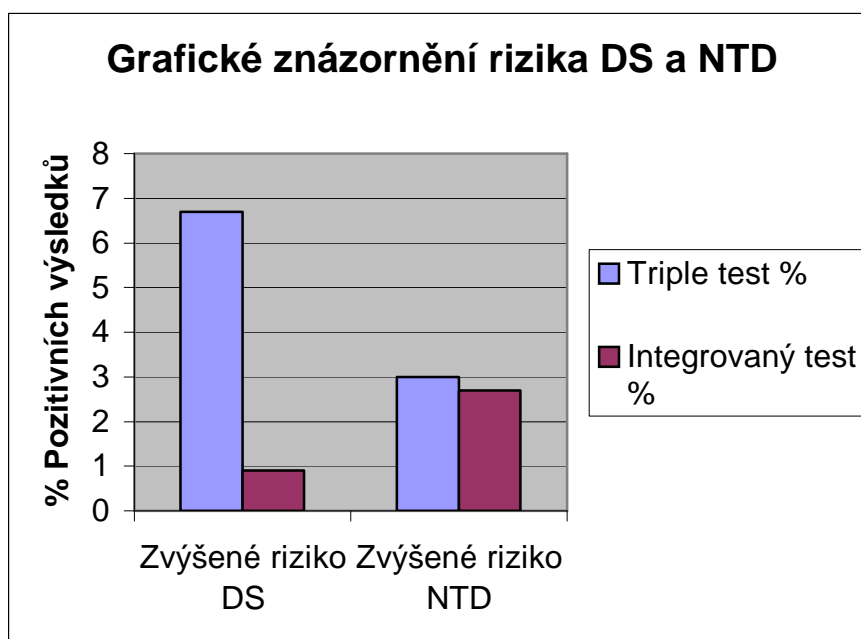
1. Samostatný kombinovaný test (PAPP-A, NT, F- β -HCG)
 - pro matky - které preferují časný výsledek
 - které se nemohou zúčastnit testu ve 2. trimestru
2. Samostatný triple test (AFP, HCG, UE3)
 - pro matky, které přichází ke gynekologovi v pokročilejším stadiu těhotenství
 - a na provedení kombinovaného testu je již pozdě
 - někdy může být důležité i ekonomické hledisko, protože kombinovaný test
 - si na rozdíl od triple testu hradí matka sama

3. Integrovaný test (kombinovaný + triple test)
- pro matky, které preferují co nejvyšší senzitivitu a zároveň co nejnižší falešnou pozitivitu.(10)

Tabulka 3: Statistické porovnání rizika Downova syndromu a NTD u triple testu a integrovaného testu

	Triple test		Integrovaný test	
	Počet testů	Výsledek v %	Počet testů	Výsledek v %
Celkem provedených testů	823	100	322	100
Zvýšené riziko - DS	55	6,7	3	0,9
Zvýšené riziko - NTD	25	3,0	9	2,7

Obrázek 3: Grafické znázornění rizika DS a NTD



13.1 Porovnání rizika DS u triple testu a u integrovaného testu

Porovnání jsme provedli u dvou různých skupin testů viz tabulka 3 na straně 30.

1. skupina obsahuje 823 triple testů.

Z nich pozitivních na DS bylo 55 což odpovídá 6.7%

2. skupina obsahuje 332 integrovaných testů.

Z nich pozitivní na DS jsou 3 což odpovídá 0.9%

Na základě statistického zpracování můžeme říci, že pokud se sníží pozitivita u integrovaného testu oproti triple testu z 6,7 na 0,9 %, nutně dojde také ke snížení FPR (zpřesnění výsledků vlivem kombinace více markerů).

Z tohoto pohledu se jeví integrovaný test jako nejvýhodnější metoda k zjištění rizika Downova syndromu.

Snížení FPR přináší snížení počtu invazivních výkonů, z čehož vyplývá nižší ekonomická náročnost i snížení psychické zátěže pro matku.

Pro jednotlivé typy screeningových testů jsou nastavena různá cut-off.

Screening Downova syndromu považujeme za pozitivní pokud jeho riziko je větší než 1:300 - u triple testu.

1:300 – u kombinovaného testu - pokud je prováděn izolovaně

1:100 – u kombinovaného testu - pokud je prováděn jako součást integrovaného testu

1:150 – u integrovaného testu

13.2 Porovnání rizika NTD u triple testu a integrovaného testu

Stejné skupiny testů jsme porovnali také z pohledu NTD.

Zjistili jsme že míra rizika vyjádřená v procentech je 3% u triple testu a 2.7% u integrovaného testu. Z tohoto pohledu je patrné, že počty pozitivních výsledků u těchto testů se nijak významně neliší.

Důvodem je, že jediným biochemickým markerem NTD je druhotrimestrální AFP, který je nezávislý na prováděném typu screeningu. Z tohoto důvodu, při srovnání triple testu (2.trimestr) a integrovaného (1.+2.trimestr) zůstává % pozitivních výsledků v podstatě na stejné úrovni.

Zvýšené riziko NTD uvažujeme tehdy, pokud je hodnota AFP větší než dvojnásobek mediánu.

Abychom mohli srovnat sérové koncentrace markerů pro různé gestační stáří hodnotíme biochemické markery v násobcích mediánu - střední hodnota souboru pro dané gestační stáří.

14 VÝSLEDKY STUDIE

Z našeho statistického porovnání můžeme odvodit, že integrovaný test je v současné době nejefektivnějším a nejekonomičtějším screeningovým systémem. Naše výsledky potvrzují to co je v literatuře popsáno ve velkých studiích SURUSS a FASTER.

V laboratoři IMALAB s.r.o. se provádí několik tisíc screeningových vyšetření ročně. V roce 2007 jich bylo provedeno téměř 2000 v 1.trimestru a 4500 ve 2.trimestru.

Z praktického hlediska ovšem není téměř možné dohledání úplně všech výsledků těhotenství. Z tohoto důvodu také není možné provést korektní výpočet senzitivity a falešné pozitivivity za sledované období. Jediným faktorem, který popisuje efektivitu screeningu pak zůstává sledování celkové pozitivivity.

Toto je také údaj, který všechny laboratoře provádějící screening v České republice každoročně zasílají do registru laboratoří.

Důvody proč výše uvedené parametry (DR a FPR) nelze v našem případě korektně vyhodnotit jsou následující:

- laboratoř dodává výsledky pro více než 100 gynekologů u nichž nelze vždy dohledat výsledek těhotenství
- migrace žen - změna gynekologa v průběhu těhotenství
- u plodů s VVV větší % potratů

Laboratoř dlouhodobě spolupracuje s centrem prenatální diagnostiky Prediko s.r.o. ve Zlíně. Tímto způsobem je zajištěna maximální mezioborová spolupráce, která je při provádění screeningu velmi potřebná. Ze širšího pohledu je dalším významným krokem v péči o nastávající maminky vybudování cytogenetické laboratoře, která zahájila činnost v letošním roce a je jediná ve Zlínském kraji.

U pozitivního výsledku screeningu je právě zde prováděno diagnostické cytogenetické vyšetření získaného biologického materiálu. U této podstatné skupiny pacientek má laboratoř k dispozici zpětnou vazbu při hodnocení výsledků.

Základem prováděného screeningu vrozených vývojových vad je dostatečná informovanost nastávající maminky o jeho možnostech a její svobodné rozhodnutí jej absolvovat.

Seznam obrázků

Obrázek 1: 47, XY, +21	17
Obrázek 2: 47, XY, +18.....	18
Obrázek 3: Grafické znázornění rizika DS a NTD	31

Seznam tabulek

Tabulka 1: Hodnota senzitivity při fixované falešné pozitivě.....	22
Tabulka 2: Hodnota falešné positivity při fixaci senzitivity.....	22
Tabulka 3: Statistické porovnání rizika Downova syndromu a NTD u triple testu a integrovaného testu.....	31

Seznam literatury

- (1) LOUCKÝ, J., POLÁK, P., *Sekvenční screening – cesta k optimalizaci senzitivity a falešné pozitivivity*. Praha, 11. ledna 2008, N. J. Wald, I. Leck, Antenatal and Neonatal Screening, Oxford Press, 2000.
- (2) HÁJEK, Zdeněk, et al. *Rizikové a patologické těhotenství*. Editor: Prof. MUDr. Zdeněk Hájek, DrSc.; Odpovědný redaktor Mgr. Luděk Neužil; obrázky do textu zhotovila Jana Nejtková. 1. vyd. Praha : Grada Publishing a.s., 2004. 444 s. ISBN 80-247-0418-8.
- (3) CANICK, Jakob, *History of the screening eLecture*, Wolfson Institute of Preventive Medicine, London, 2003
- (4) *Cytogenetická syndromologie* [online]. c2008 [cit. 2008-05-02]. Dostupný z WWW: <http://64.233.183.104/search?q=cache:hVW9rfpd6_cJ:camelot2.lf2.cuni.cz/turnovec/ubl/vyuka/prf/Cytogenetika_cloveka_PrFUK_3.ppt+Patau%C5%AFv+syndrom&hl=cs&ct=clnk&cd=2&gl=cz&client=firefox-a>.
- (5) *Genetická ambulance* [online]. c2002-2008 [cit. 2008-04-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.geneticka-ambulance.cz/screening.html/>>.
- (6) *Ordinace.cz* [online]. c2008 [cit. 2008-05-02]. Dostupný z WWW: <<http://www.ordinace.cz/clanek/downuv-syndrom-a-dalsi-chromozomalni-odchylky/>>.
- (7) *Wikipedie* [online]. c2008 [cit. 2008-05-02]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Edwards%C5%AFv_syndrom>.
- (8) *SOLEN - Medical education* [online]. c2005 [cit. 2008-04-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.solen.cz/pdfs/neu/2005/01/04.pdf>>.
- (9) *PREDIKO* [online]. c2007 [cit. 2008-04-17]. Dostupný z WWW: <http://www.prediko.cz/?art=70&m_id=89&p_id=74&pp_id>.
- (10) LOUCKÝ J., SPRINGER D., ZIMA T., *Možnosti screeningu DS v České republice*, Česká gynekologie 2008, 73, č. 3, str. 160 – 162.
- (11) J.Loucký: ústní sdělení, 20. 04. 2008.
- (12) DOLEŽALOVÁ, Věra, et al. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. 4. přeprac. vyd. Brno : Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. 286 s. ISBN 80-7013-198-5.
- (13) Vícedetektorový gama – počítač pro RIA. Vydal: Ústav radioekologie a využití jaderné techniky, Spišská Nová Ves, 30. 6. 1989.
- (14) LOUCKÝ J. a kol., *Laboratorní příručka*, 1. 2. 2007.

(15) Návod na měření – PAPP-A – IRMA – KIT 080425C, dodavatel firma
IMUNNOTECH

(16) Návod na měření –AFP – IRMA – KIT 080512A, dodavatel firma IMUNNOTECH

(17) Návod na měření –F – beta – HCG IRMA – KIT 080516A, dodavatel firma
IMUNNOTECH

(18) Návod na měření –T-HCG-screening RIA KIT 080606A, dodavatel firma
IMUNNOTECH

(19) Návod na měření –UE3 75C, dodavatel firma IMUNNOTECH