



**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**



Klinika dětí a dorostu, 3.LF UK a FNKV, Praha

**Michala Balunová**

**Plošný novorozenecký screening zo suchej krvnej  
kvapky**

*Mass neonatal screening from dry blood spot*

*Diplomová práca*

Praha, marec 2010

Autor práce: Michala Balunová

Študijný program: Všeobecné lékařství

Vedúci práce: **Prof. MUDr. Olga Hníková, CSc.**

Pracoviško vedúceho práce: **Klinika dětí a dorostu, 3. LF UK a  
FNKV**

Dátum a rok obhajoby: 1. apríl 2010

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som predkladanú prácu spracovala samostatne a použila len uvedené pramene a literatúru. Súčasne dávam povolenie k tomu, aby táto diplomová práca bola používaná k študijným účelom.

V Prahe dňa 17. 3. 2010

Michala Balunová

## **Pod'akovanie**

No tomto mieste by som rada pod'akovala všetkým, ktorí prispeli k spracovaniu tejto témy. Na prvom mieste by som chcela pod'akovať mojej školiteľke pani prof. MUDr. Olge Hníkovej, CSc. za jej drahocenný čas, odborné vedenie a trpezlivý prístup. Veľmi si cením všetky pripomienky a rady, bez ktorých by moja diplomová práca nemohla byť dokončená. Ďakujem personálu Střediska vědeckých informací 3.LF UK za poskytnutie dostupných informačných zdrojov. Moja vďaka patrí aj mojim rodičom, ktorí ma podporovali počas celého štúdia.

## Obsah

<b>ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>1. NOVORODENECKÝ SCREENING VŠEOBECNE A JEHO VÝVOJ</b> ..	<b>7</b>
1.1 ZÁKLADNÉ CIELE SCREENINGU.....	7
1.2 PRINCÍPY NOVORODENECKÉHO SCREENINGU .....	7
1.2.1 Kritériá pre screeningové vyšetrenie podľa WHO .....	7
1.2.2 Odber krvného materiálu ku screeningu.....	8
1.2.3 Spracovanie odberového materiálu.....	9
1.3 HISTÓRIA NOVORODENECKÉHO SCREENINGU.....	10
1.3.1 Vývoj novorodeneckého screeningu vo svete .....	10
1.3.2 Vývoj novorodeneckého screeningu v Českej Republike .....	12
<b>2. CHOROBY PODLIEHajúCE PLOŠNÉMU NOVORODENECKÉMU SCREENINGU ZO SUCHEJ KRVNEJ KVAPKY V ČR</b> .....	<b>16</b>
2.1 FENYLKETONÚRIA/HYPERFENYLALANINÉMIA.....	16
2.1.1 Klasická fenylketonúria.....	16
2.1.2 Iné hyperfenylalaninémie .....	17
2.1.3 Screening hyperfenylalaninémii .....	17
2.2 PRIMÁRNA KONGENITÁLNA HYPOTYREÓZA .....	18
2.2.1 Endemická kongenitálna hypotyreóza .....	18
2.2.2 Permanentná sporadická kongenitálna hypotyreóza.....	18
2.2.3 Screening kongenitálnej hypotyreózy .....	19
2.3 KONGENITÁLNA ADRENÁLNA HYPERPLÁZIA .....	20
2.3.1 Deficit enzýmu 21-hydroxylázy (P450c21) .....	21
2.3.2 Screening kongenitálnej adrenálnej hyperplázie .....	22
2.4 CYSTICKÁ FIBRÓZA .....	23
2.4.1 Screening cystickej fibrózy.....	24
2.5 DEDIČNÉ PORUCHY METABOLIZMU .....	25
2.5.1 Poruchy oxidácie mastných kyselín.....	25
2.5.2 Organické acidúrie .....	26
<b>3. ZHODNOTENIE NOVORODENECKÉHO SCREENINGU V ČESKEJ REPUBLIKE</b> .....	<b>28</b>
3.1 POJMY SÚVISIACE S HODNOTENÍM NOVORODENECKÉHO SCREENINGU ...	28
3.2 PREHEAD VÝSLEDKOV PLOŠNÉHO NOVORODENECKÉHO SCREENINGU ....	29
3.2.1 Výsledky screeningu fenylketonúrie/hyperfenylalaninémie .....	29
3.2.2 Výsledky screeningu kongenitálnej hypotyreózy .....	30
3.2.3 Výsledky screeningu kongenitálnej adrenálnej hyperplázie .....	33
3.2.4 Výsledky screeningu cystickej fibrózy.....	35
3.2.5 Výsledky screeningu dedičných porúch metabolizmu.....	36
3.3 EFEKTIVITA NOVORODENECKÉHO SCREENINGU V ČESKEJ REPUBLIKE...36	
3.3.1 Senzitivita a špecifickosť novorodeneckých screeningov .....	37
3.3.2 Ekonomický pohľad na plošný novorodenecký screening.....	38
<b>ZÁVER</b> .....	<b>39</b>
<b>SÚHRN</b> .....	<b>40</b>

<b>SUMMARY .....</b>	<b>41</b>
<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....</b>	<b>42</b>

## Úvod

Od 1. októbra 2009 došlo v Českej Republike k výraznej zmene v oblasti plošného novorodeneckého screeningu zo suchej krvnej kvapky (26). K trom klasickým a doteraz vyhľadávaným ochoreniam, medzi ktoré patrí fenylketonúria/hyperfenylalaninémia, kongenitálna hypotyreóza a kongenitálna adrenálna hyperplázia, pribudlo ďalších desať screenovaných chorôb. Zahrňujú cystickú fibrózu, šesť porúch oxidácie mastných kyselín, dve organické acidurie a jednu poruchu metabolizmu aminokyselín.

Uplynulo skoro 50 rokov od zavedenia prvého plošného novorodeneckého screeningového programu, ku ktorému došlo v štáte Massachusetts v USA. U vtedajších novorodencov sa vyhľadávala jediná vrodená porucha – fenylketonúria, ako prevencia oligofrénie. Vďaka rozvoju nových metodík a zavedeniu tandemovej hmotnostnej spektrometrie (MS/MS) došlo k obrovskému rozšíreniu spektra možných detekovateľných porúch (23). Dokonca sa objavujú práce skúmajúce možnosť testovania celého genómu zo suchej krvnej kvapky pomocou genových čipov (4).

V tejto práci by som chcela zhrnúť súčasné poznatky o plošnom novorodeneckom screeningu zo suchej krvnej kvapky a zhodnotiť jeho prínos pre populáciu v Českej Republike. V prvej kapitole sa chcem venovať novorodeneckému screeningu na všeobecnej úrovni a priblížiť jeho históriu vo svete a v Českej Republike. V druhej kapitole by som chcela čitateľa oboznámiť s jednotlivými chorobami, ktoré v súčasnej dobe podliehajú novorodeneckému screeningu. V tretej kapitole zhodnotím jeho význam v Českej Republike.

Bola by som rada, keby táto práca oboznámila odbornú verejnosť s problematikou novorodeneckého screeningu a jeho efektivitou od svojho vzniku.

## 1. Novorodenecký screening všeobecne a jeho vývoj

### 1.1 Základné ciele screeningu

Cieľom screeningu je pomocou diagnostických testov vyhľadať v danej populácii osoby, ktoré trpia určitou skryte prebiehajúcou chorobou alebo osoby, ktoré majú skrytý predpoklad k rozvoju ochorenia. Screening vyčleňuje súbor jedincov, ktorí s vysokou pravdepodobnosťou trpia daným ochorením.

Podľa zvolenej populácie, v ktorej je porucha vyhľadávaná rozdeľujeme screening na celoplošný a selektívny.

*Celoplošný* screening sa vykonáva v celej zvolenej populácii. Do tejto kategórie radíme novorodenecký screening zo suchej krvnej kvapky. Ďalšími príkladmi sú celoplošné screeningu v kojeneckom a detskom veku (vyhľadávanie porúch zmyslového vnímania, porúch vývoja pohyblivosti,...)

*Selektívny* screening je zameraný na určitú rizikovú populáciu (napr. rodiny probandov) v ktorej sa vyhľadávajú nositelia choroby (19).

### 1.2 Princípy novorodeneckého screeningu

Plošný novorodenecký screening zo suchej krvnej kvapky (NS) sa stal od svojho založenia v 60tych rokoch 20. storočia jedným z najúspešnejších programov sekundárnej prevencie. Má za cieľ aktívne a systematicky vyhľadávať vrodené choroby u novorodencov, ktoré sú v bezpríznakovom štádiu, alebo ich príznaky sú ľahko prehliadnuteľné. Umožňuje tak včasnú diagnostiku a liečbu. Je to obzvlášť dôležité v pediatrii, pretože mnohé vrodené choroby sa symptomaticky prejavia až keď pominula kritická perioda, v ktorej bola porucha reverzibilná. Počas preklinického štádia mohlo dôjsť k nezvratnému postihnutiu centrálnej nervovej sústavy (CNS), ako aj iných orgánov (23).

#### 1.2.1 Kritériá pre screeningové vyšetrenie podľa WHO

Pre celoplošné zavedenie screeningu je potrebné splnenie nasledujúcich predpokladov, ktoré boli formulované Wilsonom a Jungnerom v dokumente Svetovej zdravotníckej organizácie z r. 1968 (29).



- Vyhľadávaná choroba je jasne definovaná, je dôležitým zdravotníckym problémom a jej priebeh je známy. Je zachycovaná screeningom v presymptomatickom štádiu, keď ešte nedošlo k rozvoju ireverzibilných porúch, hlavne na úrovni CNS.
- Choroba má v danej populácii dostatočnú incidenciu, aby bolo možné očakávať záchyt významného počtu postihnutých jedincov. Vo vyspelých krajinách je hranica incidencie v rozmedzí 1:50 000-1:100 000. Na určenie incidencie je nutná pilotná štúdia, ktorá vždy predchádza zavedeniu plošného screeningu.
- Existuje terapia, ktorá je schopná zvrátiť priebeh vyhľadávanej choroby v presymptomatickom štádiu. Terapeutické opatrenia musia byť dostupné pre všetkých zachytených jedincov. Starostlivosť je väčšinou sústreďovaná do špecializovaných centier.
- Existuje všeobecne uznávaný laboratórny test zo suchej krvnej kvapky so stanovenou hranicou negativity (tzv. „cut-off“ limit). Musí mať dostatočnú senzitivitu, špecifickosť, byť cenovo dostupný a rýchly.
- Spoločnosť je schopná finančne aj organizačne zaistiť priebeh screeningu.

### 1.2.2 Odber krvného materiálu ku screeningu

*Každému novorodencovi sa bez ohľadu na jeho zrelosť, príjem potravy a zdravotný stav odoberá vzorka krvi medzi **48.-72. hodinou života** (26). U novorodencov, ktorí vyžadujú v dobe odberu (48.-72. hodina) liečbu kortikoidmi, dopamínom, prevodom krvi, plazmy, alebo výmennou transfúziou sa odber ku screeningu uskutoční *vždy pred* príslušným výkonom. U niektorých novorodencov sa vykoná tzv. „**rescreening**“, t. z. druhý odber vzorku kapilárnej krvi na rovnaký typ screeningovej kartičky, vykonaný medzi 8.-14. dňom po narodení. Rescreening sa vykonáva v nasledujúcich situáciách (26):*

- a) u všetkých novorodencov s pôrodnou hmotnosťou pod 1500 g po dosiahnutí minimálne 1500 g.
- b) u novorodencov, pokiaľ bol ich matkám 48 hodín pred pôrodom podaný liek na bázi kortikoidov.

- c) u novorodencov, pokiaľ ich matky boli v poslednom trimestri tehotenstva liečené tyreostatikami, liekmi obsahujúcimi jódové látky (napr. Amiodaron), alebo im boli podané jódové kontrastné látky.
- d) u novorodencov liečených pred odberom screeningu kortikoidmi, dopamínom, liekmi s obsahom jódových látok, alebo ak im boli podané jódové kontrastné látky.
- e) u novorodencov, ktorým bola podaná transfúzia krvného derivátu alebo im bola vykonaná výmenná transfúzia pred odberom screeningu.

Odber vzorku na screening je možné vykonať najskôr za 2 dni po podaní kortikoidov, 24 hodín po podaní dopamínu a 4 dni po transfúzii krvného derivátu.

Za odobratie vzorky zodpovedajú vedúci lekári príslušných zdravotníckych zariadení. Dbá sa na štandardnosť odberu. Na odber vzorky sa používajú dvojité kartičky, riadne označené demografickými údajmi. V prípade nejasného výsledku sa prevedie opakovaný odber – tzv. „recall“, na jeho potrebu upozorní screeningové laboratórium.

Odber vzorky sa robí 2mm sterilným vpichom lancetou do vnútorného alebo vonkajšieho okraja prekrvanej **pätičky** novorodenca. Prvá kvapka krvi so zvyškom dezinfekčného prostriedku sa zotrie a až ďalšia sa kvapne na špeciálny filtračný papierik. Na oba listy dvojitej kartičky, ktorá má starostlivo vyplnené všetky požadované demografické údaje, sa odoberú vzorky kapilárnej krvi na všetky predtlačené terčičky. Kartička sa nechá sa usušiť na špeciálnom stojane po dobu minimálne 3-4 hodín pri izbovej teplote. Po usušení sa kartičky prekryjú krycím papierom a zasielajú sa poštou na adresy screeningových laboratórií. Mali by byť odoslané do 24 hodín od odberu (26).

### **1.2.3 Spracovanie odberového materiálu**

Materiál analyzujú laboratóriá novorodeneckého screeningu. V deň analýzy sa do pripravených skúmaviek razia terčičky zo suchej krvnej kvapky (6). Laboratórne metódy stanovujú hladinu biomarkerov v mikrovzorke krvi. Jedinci postihnutí vrodenu poruchou majú podstatne odlišné koncentrácie biomarkerov od tých, ktoré sú typické pre normálnu distribúciu v populácii. To znamená, že koncentrácie biomarkerov, ktoré sú vychýlené viac ako o danú odchylku od

populačného priemeru potvrdzujú zvýšené riziko vrodenej poruchy. Novorodenci s výsledkom, ktorý je pozitívny alebo je nejasný musia podstúpiť ďalšie testovanie. Toto diagnózu buď potvrdí, výsledok bol pravdivo pozitívny (TP) alebo vyvráti (falošne pozitívny, FP). Postup overovania diagnózy je rôzny pre každú testovanú poruchu (23).

Výsledok screeningových testov by mal byť známy u donosených novorodencov do 10. dňa života. Tento termín je hraničný pre začatie liečby bez ohrozenia jedinca z dôvodu omeškania.

V súčasnosti pracujú v ČR štyri laboratóriá zaoberajúce sa novorodeneckým screeningom (26). Dve z nich sú zamerané na screening dedičných metabolických porúch metódou tandemovej hmotnostnej spektrometrie (Ústav dedičných metabolických poruch, Všeobecná fakultní nemocnice v Prahe a Laboratoř dědičných metabolických poruch, Fakultní nemocnice Olomouc). Laboratórne vyšetrenie kongenitálnej hypotyreózy, kongenitálnej adrenálnej hyperplázie a cystickej fibrózy pomocou imunoanalytických metód vykonávajú ďalšie dve laboratóriá (Laboratoř novorozeneckého screeningu, Klinika dětí a dorostu, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Prahe a Oddělení klinické biochemie a hematologie, Fakultní nemocnice Brno).

### ***1.3 História novorodeneckého screeningu***

#### **1.3.1 Vývoj novorodeneckého screeningu vo svete**

Éra novorodeneckého screeningu bola zahájená objavom profesora Roberta Guthrieho. V r. 1959 vynašiel metódu detekcie vyšších hladín fenylalanínu v suchých krvných kvapkách na filtračných papieroch. Jeho bakteriálny inhibičný test bol založený na tom, že normálna bakteriálna flóra (*Bacillus subtilis*) prestala rásť v prítomnosti antimetabolitu (B-2-thienylalanínu) v médiu. Naopak v prítomnosti fenylalanínu došlo k zrušeniu inhibície a rastu bakterií. Veľkosť bakteriálnej rastovej zóny okolo určitého vzorku zodpovedalo približnému množstvu fenylalanínu. Tento jednoduchý, lacný, ľahko reprodukovateľný test sa stal ideálnym pre plošné testovanie novorodeneckej

populácie pre fenylketonúriu. Prispela aj výborná odpoveď na terapiu nízkoproteínovou diétou s nízkym obsahom fenylalanínu ešte v reverzibilnom štádiu choroby. V r. 1962 zásluhou R.A. MacCreedyho sa stal Massachusetts prvým štátom, ktorý zaviedol plošný novorodenecký screeningový program pre fenylketonúriu (PKU). Koncom 60tych rokov bol screening pre PKU povinný vo väčšine štátov USA a rýchlo sa širil aj do ostatných krajín sveta. Je to dodnes najrozšírenejší novorodenecký screeningový program vo svete.

Bakteriálny inhibičný test bol časom prispôsobený na testovanie ďalších vrodených porúch metabolizmu aminokyselín (napr. pre chorobu javorového sirupu, homocystinúriu). Boli vyvinuté nové metódy, ktoré pomohli rozšíriť spektrum možných detekovateľných porúch. Prevratný bol objav radioimunoanalýzy (Yalowová, Berson, 1960), ktorú postupne doplnila enzymoimunoanalýza a fluorescenčná imunoanalýza.

Druhým svetovo najrozšírenejším novorodeneckým screeningom sa stal screening kongenitálnej hypotyreózy (KH). Prvé správy o možnosti screeningu KH pochádzali od Dussaulta a Labergea (1973), ktorí stanovovali tyroxín zo suchej krvnej kvapky (2). Ďalšie skupiny stanovovali hormón stimulujúci tyroideu (TSH) v pupočníkovej krvi alebo zo suchej krvnej kvapky na filtračnom papieri metódami RIA, FIA a ELISA. Prvý screeningový program pre kongenitálnu hypotyreózu bol zavedený v r. 1974 v Kanadskom Quebecu. V r. 1976 sa pri Spoločnosti Európskej Pediatrickej Endokrinológie (ESPE) vytvorila skupina, ktorej cieľom bolo masové zavedenie novorodeneckého screeningu pre KH v civilizovaných krajinách.

S rastom možných detekovateľných porúch rástla aj pracovná záťaž v laboratóriách, pretože každá choroba potrebovala svoj vlastný test.

V 90tych rokoch 20. storočia došlo vďaka zavedeniu **tandemovej hmotnostnej spektrometrie (MS/MS)** k prevratu v oblasti novorodeneckého screeningu (23). MS/MS je moderná analytická metóda, založená na princípe dvoch hmotnostných spektrometrov radených za sebou. Dokáže v priebehu málo minút identifikovať a merať metabolity (aminokyseliny, acylkarnitíny, karnitíny) vo vzorke bez nutnosti ich predchádzajúcej separácie. Má vysokú citlivosť a špecifickosť. Umožňuje stanoviť viac ako dvadsať dedičných porúch

metabolizmu (aminoacidopatie, organické acidurie a poruchy oxidácie mastných kyselín) z jednej analýzy suchej krvnej kvapky. Jej zavedenie do praxe je však spojené s novými etickými otázkami.

Počet ochorení detekovateľných pomocou novorodeneckého screeningu zo suchej krvnej kvapky vďaka vedeckému a technologickému pokroku stále rastie. Spektrum možných detekovateľných porúch zahŕňa endokrinopatie (vrodená hypotyreóza, kongenitálna adrenálna hyperplázia), hemoglobínopatie, infekčné choroby (toxoplazmóza, vírus ľudskej imunodeficiencie [HIV]), cystickú fibrózu a vrodené poruchy metabolizmu. Prebehli pilotné štúdie pre screening tezurizmóz, ťažkého kombinovaného imunodeficitu, X-viazanej adrenoleukodystrofie a iných porúch peroxisómov. Objavujú sa štúdie skúmajúce možnosť sceeningu celého ľudskeho genómu pomocou genových čipov zo suchej krvnej kvapky (4).

Plošné novorodenecké screeningové programy sú odlišné v rôznych krajinách. Niekedy sa líšia aj v rôznych štátoch tej istej krajiny. Súvisí to najmä s odlišnou zdravotníckou politikou, ktorá zohľadňuje epidemiologické, etnické, sociálne, ekonomické a etické faktory (18). Choroby, ktoré sú najčastejšie zahrnuté do národných screeningových programov sú: fenyلكetonúria/hyperfenylalaninémia, kongenitálna hypotyreóza, kongenitálna adrenálna hyperplázia, cystická fibróza, srpkovitá anémia a iné hemoglobínopatie, galaktozémia, deficit biotinidázy, choroba javorového sirupu a deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom (MCAD).

### **1.3.2 Vývoj novorodeneckého screeningu v Českej Republike**

V roku 1958 pani docentka MUDr. Bohunka Blehová z pražskej Vinohradskej Kliniky detí a dorastu zahájila vyhľadávanie detí s fenyلكetonúriou. Použila vtedy dostupný močový test s chloridom železitým. Po testovaní na zdravých deťoch a vylúčení falošnej pozitivity pokračovala výskumom na oligofrénných pacientoch v psychiatrických liečebňách. V Opařanech zo 714 vyšetrených detí bolo nájdených 8 s pozitívnymi nálezmi (1). Od roku 1960 so svojimi zástancami apelovala na Českú pediatrickú obec, aby bol screening PKU vykonávaný v 4.-6. týždni života pomocou močového testu započatý už

v novorodeneckom období. V r. 1964 Doc. MUDr. Josef Hyánek inicioval novorodenecký screening PKU na gynekologicko-pôrodnických klinikách v niektorých Pražských nemocniciach. Použil pri tom namiesto moči kapilárnu krv z pätičky novorodenca a vyšetroval ju chromatografickou metódou podľa Efronovej. Jeho návrh použiť túto metódu pre celopopulačný screening pre politickú situáciu v r. 1968 neprešiel (17).

Neskôr sa pozornosť sústredila na Guthrieho metódu, ktorá bola postupne zavádzaná ako screeningová metóda vo svete. Bola vyskúšaná na klinike v pražských Vinohradoch (Blehová, Tomašoffová, 1966) a ukázalo sa, že potrebuje minimálne vybavenie laboratória. Vznikla snaha vyvinúť domáci test bez nutnosti dovozu zo zahraničia. Doc. MUDr. Blehová spolu s Ing. Židlickým, z Výskumného ústavu pre farmáciu a biochémiu v Prahe, vypracovali vlastný postup pre výrobu testovacích súprav. V r. 1970 začala úspešná výroba testu v Imune, Šarišské Michaľany (1,3).

Pilotná štúdia prebehla v rokoch 1970-1972, bolo vyšetrených celkom 138 259 novorodencov, potvrdilo sa 16 prípadov fenyktonúrie. Povinný novorodenecký screening **PKU/HPA** bol zavedený od **1. 1. 1975** Věstníkem MZD ČSR, XV/1975. Vyšetrenie bolo realizované **Guthrieho metódou** 5.-6. deň po narodení zo suchej krvnej kvapky, pokiaľ dieťa aspon 24 hodín prijímalo bielkovinovú stravu. Screeningom boli poverené dve laboratória v Prahe (Fakultní nemocnice Královské Vinohrady; Ústav dědičných metabolických poruch) a jedno laboratórium v Brne (3).

Ďalším míľnikom v histórii novorodeneckého screeningu bolo zavedenie kongenitálnej hypotyreózy do celonárodného preventívneho programu. Zaslúžila sa o to pani profesorka MUDr. Olga Hníková, CSc. so svojimi spolupracovníkmi. V r. 1975 stanovovali radioimunoanalýzou (RIA) TSH z pupočníkovej krvi, od r. 1977 modifikáciou RIA tyroxín zo suchej krvnej kvapky u všetkých novorodencov narodených v pražskej Vinohradskej nemocnici (11). V rokoch 1981-1983 prebehla pilotná štúdia. Z celkom 45 000 vyšetrených novorodencov bol výskyt kongenitálnej hypotyreózy 1:5 000. Behom roku **1985** bol screening **KH** postupne uplatnený na celom území Československa (6,9,10).

V r. 1996 došlo k zmene metodiky screeningu KH. V období **1985-1995** sa zo suchej krvnej kvapky stanovoval **celkový tyroxín** (metódou RIA). Toto vyšetrenie nebolo dostatočne citlivé na to, aby detekovalo čiastočne kompenzovanú primárnu hypotyreózu s hranične normálnym tyroxínom a zvýšeným TSH. Táto jednotka je častejšia u ektopickej štítnej žľazy, môže spôsobovať poškodenie vývoja CNS, pokiaľ nie je včas liečená. Recall rate bol pri screeningovej metóde s celkovým tyroxínom vyšší – cca 1%. Z tohto dôvodu sa **od r. 1996** stanovuje **TSH** v suchej krvnej kvapke metódou DELFIA, ktorá je vysoko špecifická a senzitívna pre stanovenie TSH. TSH zo screeningu je ďalej využívané i k monitorovaniu jódového zásobenia novorodeneckej populácie (WHO, ICCIDD 1994) (13).

Tretím vo svete najčastejšie zavádzaným plošným novorodeneckým screeningovým programom je screening kongenitálnej adrenálnej hyperplázie (CAH). Je založený na meraní koncentrácie hladiny  $17\alpha$ -hydroxyprogesterónu v suchej krvnej kvapke na filtračnom papieriku pomocou fluoro- alebo enzymoimunoeseje. V r. 2001 prebehla pilotná štúdia v spáde FN Kráľovské Vinohrady, bolo vyšetrených 26 502 novorodencov-chlapcov a dokázaná jeho potreba v Českej Republike (27). Za zaradenie screeningu CAH do celoplošného screeningu sa aktívne angažoval doc. MUDr. Felix Votava Ph.D. so svojimi spolupracovníkmi. Od r. **2006** je screening **CAH** pripojený k plošnému novorodeneckému screeningu PKU/HPA a KH (3).

V posledných rokoch v ČR narastajú skúsenosti s MS/MS. Pilotná štúdia screeningu dedičných metabolických porúch (DMP) prebiehala v rokoch 2001-2005. Za túto dobu bolo vyšetrených v Ústave dedičných metabolických porúch 45611 novorodencov a 19058 pacientov s podozrením DMP. DMP bola diagnostikovaná u 8 novorodencov, čo zodpovedalo incidencii 1:5700 a u 22 pacientov s podozrením na DMP, incidencia bola 1:870 (25). Viedli sa diskusie o rozsahu vyšetrovaných porúch. Mnoho chorôb nespĺňalo kritériá pre screening podľa pravidiel WHO (viď odst. 1.2.1). Vo svete sú rôzne trendy, sú krajiny s vysokým počtom detekovaných porúch, napr. USA, Nemecko, Rakúsko a naopak krajiny, kde je počet screenovaných DMP nízky. V ČR sa uvažovalo o vyšetrení 10-15 porúch.

V rokoch 2005-2006 prebiehala v ČR pilotná štúdia novorodeneckého screeningu cystickej fibrózy (CF). Dôvodom bolo zistenie významne pozdnej diagnostiky CF od roku 1999, súvisiacou pravdepodobne s decentralizáciou zdravotníckej starostlivosti (20). Metóda detekcie CF zo suchej krve kvapky je založená na meraní koncentrácie imunoreaktívneho trypsínu (IRT). Dôvodom pre stanovovanie IRT je fakt, že keď sú pankreatické ducty blokované, vedú k spätnému presakovaniu acinárnych produktov, vrátane trypsínu a trypsinogénu, do cievného systému (31). Pilotný projekt bol navrhnutý podľa schémy IRT/DNA/IRT. Bolo vyšetrených 76 438 novorodencov a detekovaných 11 prípadov CF, z toho 4 boli predom klinicky diagnostikované. Štúdia dokázala potrebu NS CF a zhodnotila aplikovaný vyšetrovací algoritmus ako účinný (20).

K zatiaľ poslednej zmene v oblasti plošného novorodeneckého screeningu v ČR došlo od **1. 10. 2009** (26). Věstník Ministerstva zdravotnictví ČR 006/2009 rozšíril PNS o nové vyšetrované choroby a mení postup pri jeho vykonávaní. Novinkou je detekovanie **deviatich DMP** pomocou MS/MS a zaradenie **cystickej fibrózy** medzi screenované ochorenia. Medzi vyšetrované DMP sú zaradené:

- a) fenylketonúria (PKU) a hyperfenylalaninémia (HPA)
- b) leucinóza (choroba javorového sirupu, MSUD)
- c) deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom (MCAD)
- d) deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín s veľmi dlhým reťazcom (VLCAD)
- e) deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín s dlhým reťazcom (LCHAD)
- f) deficit karnitínpalmytoyltransferázy I (CPT I)
- g) deficit karnitínpalmytoyltransferázy II (CPT II)
- h) deficit karnitínacylkarnitíntranslokázy (CACT)
- i) glutarová acidúria typ I (GA I)
- j) izovalerová acidúria (IVA)



2. Choroby podliehajúce plošnému novorodeneckému screeningu zo suchej krvnej kvapky v ČR

### **2.1 Fenyktonúria/hyperfenylalaninémia**

Je známych niekoľko porúch, ktoré sú klinicky a biochemicky odlišné a vedú k hyperfenylalaninémii. Hromadenie fenylalanínu a jeho metabolitov spôsobuje ťažké somatické, ale hlavne psychické poškodenie dieťaťa už niekoľko mesiacov po jeho narodení.

#### **2.1.1 Klasická fenyktonúria**

Je dedičná porucha metabolizmu, ktorá sa dedí autozómovo recesívnym spôsobom, gén pre fenyktonúriu je lokalizovaný na chromozóme 12q. Incidencia je 1:10 000 živonarodených detí. Fenyktonúria je najčastejšou príčinou oligofrénie, podieľa sa v 1-2% na jej vzniku (24).

Príčinou je deficit enzýmu fenylalanínhydroxylázy (PHA), ktorý katalyzuje premenu aminokyseliny fenylalanínu na tyrozín (15).

Klinický obraz. Príznaky sa rozvíjajú až od 2. mesiaca života. Častá je dráždivosť a vracanie; moč má typický myšací zápach; koža je drsná, suchá; vlasy sú v 90% plavé a dúhovky modré. Deti sú bledšie ako ich súrodenci. Od 9. mesiaca je psychomotorická retardácia výrazná. Podľa literatúry fenyktonúria znižuje inteligenčný kvocient asi o polovicu (24). Môžu sa vyskytnúť kŕče, zmeny na EEG, hypertonia svalstva, hyperreflexia, atetóza, mikrocefália.

Len skorá liečba v prvých týždňoch života dokáže zabrániť **trvalej a neskôr na liečbu ireverzibilnej mentálnej retardácii. Mala by sa zahájiť do najneskôr 21.dňa po pôrode** (16).

Terapia spočíva v diéte s nízkym obsahom fenylalanínu a v suplementácii esenciálnych aminokyselín. Terapeutické hladiny fenylalanínu by nemali byť vyššie ako 360  $\mu\text{mol/l}$  v prvých 6.-10. rokoch života. Pre teenagerov je diéta liberálnejšia. Veľmi prísne musia byť kontrolované hladiny fenylalanínu pred a počas celého tehotenstva, aby nedošlo k vzniku tzv. maternálnej PKU (15).

### 2.1.2 Iné hyperfenylalaninémie

Je to skupina DMP, HPA je vyvolaná iným mechanizmom enzymatického poškodenia ako u klasickej PKU.

**Fenylketonúria z deficitu tetrahydrobiopterínu (BH4).** BH4 má v organizme viac funkcií. Okrem toho, že je kofaktorom fenylalanínhydroxylázy, je kofaktorom aj pre hydroxylázy tyrozínu a tryptofánu. Správna funkcia týchto hydroxyláz je nutná pre správny vývoj CNS, pretože umožňujú syntézu nervových mediátorov serotonínu a dopamínu (24). Ak je syntéza BH4 nedostatočná, príznaky a dôsledky sú rovnaké ako pri klasickej PKU. Samotná terapia nízkofenylalanínovou diétou je však v tomto prípade neúčinná! Pred trvalým poškodením CNS pacienta ochráni podávanie L-dopy, karbidopy a serotonínu v diéte. Preto majú byť všetci novorodenci s pozitívnym screeningom HPA vyšetrení aj na deficit BH4 (15).

### 2.1.3 Screening hyperfenylalaninemií

V súčasnosti sa zvýšená hladina fenylalanínu meria pomocou MS/MS zo suchej krvnej kvapky. Normálne hladiny sú  $<150\mu\text{mol/l}$ , stredne vysoké hladiny sú v rozmedzí  $150\text{--}360\mu\text{mol/l}$  a vysoké  $>360\mu\text{mol/l}$ . Pri detekcii vysokých hodnôt je nutné kvantitatívne vyšetriť aminokyseliny v plazme so zameraním na hladiny tyrozínu a fenylalanínu (15). Novorodenci by mali byť ihneď prijatí na pracovisko so skúsenosťami s liečbou metabolických porúch. Ďalší dôležitý krok je vylúčenie deficitu BH4 pomocou testu s BH4, analýza močových pterínov a stanovenie aktivity dihydropterínreduktázy v krvi. Ak je vylúčený deficit BH4 a hladina fenylalanínu v plazme je  $>600\mu\text{mol/l}$ , prípadne dokázaná mutácia génu pre PHA, jedná sa o klasickú PKU. Ak je pri takých istých nálezoch hladina fenylalanínu v plazme v rozmedzí  $360\text{--}600\mu\text{mol/l}$ , jedná sa o miernu formu HPA (15). Pri dokázanom deficite BH4 je príčinou hyperfenylalaninémie porucha v syntéze alebo v metabolizme kofaktoru BH4.

## **2.2 Primárna kongenitálna hypotyreóza**

Kongenitálna hypotyreóza (KH) je ochorenie charakterizované vrodene zníženou až vymiznutou činnosťou štítnej žľazy, prípadne zníženou citlivosťou periférnych orgánov na tyreoidálne hormóny. Klinická symptomatológia sa typicky rozvíja pomaly, diagnostika aj liečba bola pred zavedením povinného screeningu často opozdená. Tyreoidálne hormóny (a jód ako ich stavebný prekurzor) zastávajú v detskom organizme mimoriadnu úlohu. Ovplyvňujú metabolizmus, celkový rast v postnatálnom období a vývoj CNS od fetálneho obdobia po dosiahnutie 3. roku života (14,15). Kongenitálna hypotyreóza bola jedna z najčastejších príčin mentálnej retardácie, ktorej možno zabrániť včasnou substitúciou chýbajúceho tyroxínu.

### **2.2.1 Endemická kongenitálna hypotyreóza**

Vyskytuje sa v oblastiach s jódovým deficitom. Príčinou tejto formy KH je nedostatočné jódové zásobenie matky, ktoré má za následok insuficientnú tvorbu tyreoidálnych hormónov behom tehotenstva. Plod trpí jednak nedostatkom materského tyroxínu, jednak následným nedostatkom jódu pre plodovú štítnu žľazu, čo má následky v porušenom raste a vývoji CNS. Zaistenie dostatočnej dodávky jódu po pôrode neovplyvní už vzniknutú mentálnu poruchu. Prevenciou je eliminovať jódový deficit, hlavne u tehotných žien, kde je potreba jódu oproti ostatnej populácii značne zvýšená [200-300 µg/deň] (14).

### **2.2.2 Permanentná sporadická kongenitálna hypotyreóza**

Sporadická forma KH je dôsledkom viacerých možných stavov. V cca 60% je príčinou **dysgenéza štítnej žľazy** (aplázia, hypoplázia, ektopia, hemityreoidea), v cca 30% **dyshormonogéza** (chýbanie alebo nedostatok enzýmov nutných k syntéze tyreoidálnych hormónov) (14). Najťažšie formy sú spôsobené apláziou štítnej žľazy alebo kompletnou dyshormonogézou. Vzácné je príčinou sporadicej KH syndróm rezistencie periférie k tyreoidálnym hormónom, sekundárna hypofyzárna alebo terciárna hypotalamická KH. Dlhodobá incidencia permanentnej primárnej KH v ČR je 1: 4230 (7).

Zvýšené percento využitia transplacentárne preneseného materského tyroxínu a zvýšená aktivita mozgovej dejodázy u porúch plodovej štítnej žľazy majú protektívny účinok na rozvoj poškodenia CNS behom tehotenstva.

Príčiny KH sú multifaktoriálne. V cca 5% sú príčinou genetické mutácie (14).

Klinický obraz. Príznaky sú u novorodencov nenápadné. Môže byť prítomný prolongovaný novorodenecký ikterus a perzistujúca malá fontanela u detí narodených v termíne. Ďalšie príznaky sa vyvíjajú postupne pozdejšie. Je to makroglosia, presiaknutie podkožia, porucha príjmu potravy, umbilikálna hernia, zápcha, letargia, svalová hypotonia, porucha rastu s poruchou kostného zrenia a poruchou zubnej zrelosti, chrapľavý hlas. U pozde liečených detí (únik zo screeningu) bývali známky neurologického postihnutia (8).

**Terapia** je založená na **substitúcii chýbajúceho tyroxínu**. Musí byť zahájená **včas, najneskôr do 14tich dní po narodení** (8,11). Optimálna iniciálna dávka L-tyroxínu je podľa posledných doporučení ESPE (European Society for Paediatric Endocrinology) 10-15 µg/kg/deň. Je nutné v pravidelných intervaloch kontrolovať hladiny tyreoidálnych hormónov (fT4, ssTSH). Dlhodobé nedostatočné hladiny majú za následok klinické príznaky hypotyreózy (znížený rast a prospievanie dieťaťa), naopak nadmerné dávky môžu vyvolať hypertyreózu s urýchlením kostného zrenia. Hodnoty TSH by mali byť udržiavané trvale pod 3mIU/l (8). Dôležité je pravidelné sledovanie psychomotorického vývoja a kontrolovanie stavu štítnej žľazy ultrazvukom (7,8,11,12).

### 2.2.3 Screening kongenitálnej hypotyreózy

Screening je v ČR v súčasnej dobe založený na zisťovaní hladiny **TSH** v suchej krvnej kvapke **imunologickou metódou** (DELFI). Výhodou tejto metódy je zachytenie čiastočne kompenzovanej primárnej hypotyreózy. Touto metódou nie sú odhalené jedinci so sekundárnou alebo terciárnou KH. Funkčné poruchy štítnej žľazy sú pri centrálnych poruchách vo veľkej väčšine malé, nedochádza k poruchám vývoja CNS (19).

V rodinách, kde je dokázaný výskyt vrodenej dyschormonogenézy, je u novorodencov ešte pred odberom kapilárnej krvi z pätičky zaistovaný **odber pupočníkovej krvi**. Dôvodom je relatívne vysoká pravdepodobnosť postihnutia

novorodenca KH. Snahou je čím skorší záchyt ochorenia, ktoré umožní skoršie zahájenie terapie.

**Z kapilárnej krvi** je screening KH realizovaný **od 48.hodiny** po narodení. Pri hodnotách TSH v suchej krvnej kvapke *nad 15,0 mIU/l* (tzv. pozitívny záchyt) nutné ďalšie vyšetovanie (26).

U novorodencov nasleduje potvrdenie suspektného výsledku opakovaným vyšetrením TSH z pôvodnej suchej krvnej kvapky. Ďalším krokom je stanovenie koncentrácií TSH, fT4, T3, Tg a prípadne SHBG vo venóznej krvi. Nasledujúci postup zahŕňa ultrazvuk (ev. scintigrafiu) štítnej žľazy, vyšetrenie jodúrie, stanovenie prítomnosti antityroidálnych protilátok, určenie gestačného kostného veku a echokardiografiu kvôli nožnej prítomnosti perikardiálneho výpotku. Vyšetrenia sú zamerané aj na matku novorodenca s pozitívnym screeningom (8).

Od r. 2002 je do následnej starostlivosti o pacientov s potvrdenou diagnózou KH zaradený *screening vrodenných sluchových vád* u novorodencov, event. najdlhšie do troch mesiacov po pôrode. Vyšetrujú sa tranzientné otoakustické emisie. Výskyt vrodenných sluchových vád je vysoký (1: 25 permanentných primárnych KH) (7,8,12). Rehabilitačnú liečbu sluchu je dôležité zahájiť už okolo 6. mesiaca života (14).

Screening KH s použitím TSH screeningovej metódy odhaľuje i jedincov s tranzientnými poruchami štítnej žľazy (7,8,14). Patria medzi ne: tranzientná hypotyreóza, ktorá býva najčastejšie spojená s výrazným jódovým deficitom alebo vzácnejšie s vysokými hladinami materských antityroidálnych protilátok a ďalej tranzientná izolovaná hypertyrotropinémia, ktorá býva markerom pozdejšej tyreopatie a vyžaduje starostlivé vyšetrenie a sledovanie odborníkmi v oblasti endokrinológie.

### **2.3 Kongenitálna adrenálna hyperplázia**

Kongenitálna adrenálna hyperplázia (CAH) je skupina autozomálne recesívnych dedičných ochorení, s incidenciou 1:10 000-14 000 v ČR (29). Génové mutácie spôsobujú defektnú funkciu enzýmov, ktoré sú nutné pre normálnu syntézu steroidov (gluko- a mineralokortikoidov) v kôre nadľadvín.

Spektrum klinických prejavov je veľmi široké, závisí na type a miere enzymatického defektu.

<b>Deficit enzýmu 21-hydroxylázy (P450c21)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Klasická CAH<ul style="list-style-type: none"><li>- so soľnou poruchou</li><li>- bez soľnej poruchy</li></ul></li><li>▪ Neklasická CAH</li></ul>
<b>Deficit 3<math>\beta</math>-hydroxysteroid dehydrogenázy</b>
<b>Deficit enzýmu 11<math>\beta</math>-hydroxylázy (P450c11)</b>

**Tab. 1 Najčastejšie formy kongenitálnej adrenálnej hyperplázie**

Zdroj: VOTAVA F. *Novorozenecký screening kongenitálnej adrenálnej hyperplázie. Disertačná práca.* Praha 2005

Deficit kortikoidov spôsobuje spätnou väzbou vyplavenie adrenokortikotropného hormónu (ACTH). ACTH indukuje zvýšenú produkciu steroidných prekursorov, ktoré vedú kvôli prítomnosti enzymatického bloku k zvýšenej tvorbe androgénov.

### 2.3.1 Deficit enzýmu 21-hydroxylázy (P450c21)

Najčastejšia enzymatická porucha je deficit 21-hydroxylázy. Má dve hlavné klinické formy, klasickú a neklasickú.

**Klasická CAH** tvorí 90-95% všetkých prípadov CAH. Je klinicky najvýznamnejšia, prejavuje sa už v novorodeneckom období. Pacientky ženského pohlavia sa rodia s rôznym stupňom virilizácie vonkajšieho genitálu (popisované škálou podľa Pradera I-V). Postihnutí novorodenci mužského pohlavia sú klinicky nemí. Podľa závažnosti klasickú formu CAH delíme na dve podskupiny, ktoré tvoria hranice klinického kontinua.

*Klasická CAH so soľnou poruchou* (SW – tzv. salt wasting), je charakterizovaná virilizáciou vonkajšieho genitálu dievčatok in utero. Aktivita enzýmu je nulová, vedie k najťažšiemu stupňu nadľadvinovej nedostatočnosti (chýbanie gluko-, mineralokortikoidov, nadbytok ACTH). Bezprostredne

ohrozuje život v prvých týždňoch života. Úmrtia sú časté hlavne u chlapcov. Tvorí 75% klasických foriem (27,29).

*Klasická CAH bez soľnej poruchy (SV – tzv. simple virilizing).* Aktivita enzýmu je 1-5%. Prejavuje sa virilizáciou postihnutých dievčatiek in utero, ale nedochádza k soľnej poruche z nedostatku mineralokortikoidov. Tvorí 25% klasických foriem (27,29).

Klinický obraz. Je daný nadľadvinovou nedostatočnosťou a nadprodukciou androgénov, spôsobené zvýšenou produkciou ACTH. Adrenálna kríza z nedostatku aldosterónu sa rozvíja v 2.-4. týžni života. Prejavuje sa zvracaním, letargiou, poruchou kŕmenia, závažnou dehydratáciou, šokom až smrťou. V laboratórnych nálezoch je typická hyponatrémia, hyperkalémia a acidóza (3). Môže dôjsť k závažnému ireverzibilnému poškodeniu CNS, ktoré limituje pacienta po prežití adrenálnej krízy. Deficit kortikoidov ohrozuje jedinca hypoglykémiou a ťažkým zvládaním záťažových situácií (napr. infekcií). Patologická androgénna aktivita spôsobuje virilizáciu vonkajšieho genitálu u dievčatiek in utero. Pokiaľ nie je CAH rozpoznaná a liečená, vedie v 3.-6. roku k rozvoju predčasnej pseudopuberty so všetkými negatívnymi dopadmi na rast jedinca (16, 29). U chlapcov sa rozvíja predčasná pseudopuberta izosexuálna, u dievčatiek heterosexuálna. Nadprodukcia ACTH sa môže prejavovať kožnými hyperpigmentáciami, vedie k hyperplázii nadľadvín.

**Neklasická CAH (LO – tzv. late onset)** nikdy neohrozuje postihnutých jedincov soľnou poruchou, nie je taká závažná. Väčšinou prebieha pod obrazom postupne sa rozbiehajúcej virilizácie, ktorá sa prejavuje v období prepuberty.

**Terapia** je založená na substitúcii gluko- a mineralokortikoidov, úprave vnútorného prostredia a na prípadnej chirurgickej korekcii virilizovaného genitálu u dievčat. Substitúcia steroidnými hormónmi by mala byť započatá čím skôr, aby nedošlo k rozvoju adrenálnej krízy.

### 2.3.2 Screening kongenitálnej adrenálnej hyperplázie

Diagnostika CAH na základe klinického obrazu bola v ČR v období pred zavedením screeningu často nedostatočná. Týkalo sa to hlavne chlapcov a tej

skupiny dievčat, ktoré boli kvôli ťažkému stupňu virilizácie vonkajšieho genitálu označené za chlapcov bez semenníkov v semenných vačkoch (2,27,28,29,30).

Screening CAH je v ČR založený na meraní koncentrácií **17 $\alpha$ -hydroxyprogesterónu (17-OHP)** v suchej krve kvapke na filtračnou papieri pomocou fluoroimunoeseje (FIA). Screeningový test je pripravený pre deficit 21-hydroxylázy. Je **zameraný na odhalenie jedincov s tzv. SW formou**, ktorá je potencionálne smrteľná a vyžaduje dostatočne skorú terapiu (29). Pacienti s miernejšou, tzv. SV formou, môžu tiež zo screeningu profitovať, aj keď u nich adrenálna kríza nehrozí. Screening nevyhľadáva jedincov s neklasickou formou CAH. Pokiaľ test ukazuje na možnosť CAH (17-OHP >40nmol/l), pre potvrdenie alebo vylúčenie sa stanovuje hladina 17-OHP v sére (15).

## **2.4 Cystická fibróza**

Cystická fibróza (CF, mukoviscidóza) je pokladaná za najčastejšie život ohrozujúce autozomálne recesívne dedičné ochorenie bielej rasy. Je spôsobená mutáciami v oboch alelách génu pre CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator = transmembránový regulátor vodivosti). CFTR je gén kódujúci proteín chloridového kanálu. Je známych viac ako tisíc mutácií tohoto génu, 68% mutácií tvorí mutácia  $\Delta F508$  (16). Mutácie vedú k porušenej funkcii chloridového kanálu, je porušený transport iónov apikálnou membránou buniek. CFTR je exprimovaný len na niektorých epitelových bunkách organizmu, medzi ktoré patria bunky respiračného, tráviaceho, urogenitálneho traktu, bunky pankreasu, žľčových kanálov a potných žliaz. V respiračnom, tráviacom a reprodukčnom ústrojenstve vedie hromadenie iónov k zvýšenej resorpcii vody z lumen a tým k zahusťovaniu hlienu. V pote je vysoká koncentrácia chlóru a sodíku. CFTR je dôležitý pre ingesciu *Pseudomonas aeruginosa*, u CF je táto funkcia porušená.

V ČR sa vyskytuje u 1:2500-3000 narodených. Medzi klasické prejavy tohto multisystémového ochorenia patrí chronická choroba dýchacích ciest, insuficiencia exokrinného pankreasu, vysoká koncentrácia elektrolytov v pote a obštruktívna azoospermia (16).



Klinický obraz. Závisí na veku, v ktorom sa objavia prvé príznaky. Medzi najčastejšie prejavy u novorodencov patrí mekóniový ileus (15%), prolaps rekta, neprospievanie so steatoreou, rekurentné respiračné infekcie. Ochorenia dýchacích ciest sú najčastejšou príčinou morbiditu a mortality. Postihnutí jedinci sú často postihnutí rekurentným kašľom, ktorý progreduje do choronického zápalu dolných dýchacích ciest a častých infekcií (Stafylokokus aureus, Burkholderia cepacia, Pseudomonas aeruginosa). U viac ako 90% pacientov s klasickou formou CF sa vyvinie insuficiencia exokrinného pankreasu s malabsorpciou (26). Matky môžu pozorovať u svojich postihnutých detí slaný pot, novorodenci môžu mať proťahovaný ikterus a opuchy z hypoproteinémie.

**Terapia** je založená hlavne na profylaxii a agresívnej liečbe pľúcnych infekcií, podávaní mukolytík, suplementácii pankreatických enzýmov a podpore výživy. V budúcnosti by značne zlepšila prognózu génová terapia.

**Prognóza** sa v posledných desaťročiach výrazne zlepšila, dnes narodení majú nádej na prežitie 40 rokov.

#### 2.4.1 Screening cystickej fibrózy

Diagnostika CF do prvých dvoch mesiacov života je hodnotená ako dobrý prognostický faktor dlhodobého priebehu ochorenia a významne znižuje úzkosť rodičov kvôli pozdnej diagnostike.

Screening CF v ČR je založený na meraní koncentrácie **imunoreaktívneho trypsinogénu (IRT) v suchej krvnej kvapke na filtračnom papieri fluoroimunologickou esejou (DELFI)**. V prípade pozitívneho výsledku nasleduje „*tzv. druhý analytický krok*“, ktorý spočíva v **molekulárne genetickej analýze** v populácii najčastejších a jednoznačne patogénnych génových mutácií CFTR. Zdrojom DNA sú tie isté suché krvné kvapky na filtračných papieroch, z ktorých bol pozitívny záchyt IRT. Spoločnosť lekárskej genetiky ČSL JEP vydala pre DNA analýzu v rámci plošného novorodeneckého screeningu výnimku, o tzv. a priori informovanom súhlase s genetickým vyšetrením. Ak je nájdená jedna alebo dve mutácie CFTR, proband je odoslaný na príslušné odborné pracovisko k vykonaniu potného testu. „*Tzv. tretí analytický krok*“ je zahájený pri nedokázanej mutácii CFTR, ale vysoko zvýšenej hladiny IRT. Je

nutný opakovaný odber suchej krvnej kvapky na filtračný papier („recall“), ktorý je nutné vykonať do 10. týždňa života. Opäť sa stanovuje koncentrácia IRT, ak je zachytená vysoká hodnota, proband je odoslaný k vykonaniu potného testu pilokarpínovou elektroforézou. Pri náleze jednej mutovanej alely CFTR (ide o nosiča CF) je rodičom oznámený výsledok screeningu ako negatívny, rodine je však doporučené genetické poradenstvo (20,26).

## **2.5 Dedičné poruchy metabolizmu**

### **2.5.1 Poruchy oxidácie mastných kyselín**

Táto skupina porúch je spôsobená mutáciou v géne kódujúcom niektorý z mitochondriálnych enzýmov podieľajúcim sa na oxidácii mastných kyselín. Pre vstup mastných kyselín s dlhým reťazcom do mitochondrie, kde prebieha  $\beta$ -oxidácia, je nutná prítomnosť karnitínu. Karnitínpalmitoyltransferáza typu I (CPT I), ktorá sa nachádza na vonkajšej mitochondriálnej membráne, tvorí z acyl-CoA s dlhým reťazcom acylkarnitínu. Tie sú ďalej transportované cez vnútornú mitochondriálnu membránu pomocou karnitínacylkarnitíntranslokázy (CACT). V mitochondrii je acylkarnitín štiepený na acyl-CoA a karnitín pôsobením karnitínpalmitoyltransferázy typu II (CPT II). Acyl-CoA vstupuje do  $\beta$ -oxidácie, kde sú pomocou enzýmov dehydrogenáz (špecifické pre rôznu dĺžku mastných kyselín) postupne skracované reťazce mastných kyselín o 2 atómy uhlíku. Špecifické dehydrogenázy zahŕňujú acyl-CoAdehydrogenázu pre mastné kyseliny so stredne dlhým reťazcom (MCAD), acyl-CoAdehydrogenázu pre mastné kyseliny s veľmi dlhým reťazcom (VLCAD) a 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázu mastných kyselín s dlhým reťazcom (LCHAD). Deficit daného enzýmu vedie k hromadeniu acylkarnitínov, ktoré podľa dĺžky a vzájomného pomeru ukazujú, ktorý enzým je nefunkčný. Toto je základom pre diagnostiku a pre plošný NS kde sa využíva metóda MS/MS. Stanovujú sa hladiny karnitínov a acylkarnitínov zo suchej krve kvapky na filtračnom papieri. Potvrdeniu diagnózy pri pozitívnom screeningu pomáha meranie koncentrácie karnitínov a acylkarnitínov v plazme, organických kyselín v moči, enzymatické štúdie na fibroblastoch alebo DNA analýza génových mutácií (15).

Klinický obraz: Je zapríčinený nedostatkom energie z porušeného metabolizmu mastných kyselín. K prvým prejavom môže dôjsť už 24 hodín po pôrode, keď sa vyčerpajú zásoby glykogénu (15,21,22). Najčastejšie klinické príznaky zahŕňujú hypoketotickú hypoglykémiu, hyperamonémiu a hepatopatiu (Reye-like syndrom – s akútnou poruchou vedomia, kŕčmi, hepatomegáliou). Môžu sa manifestovať ako náhle úmrtie u novorodencov (SIDS). Neskôr sa prejavujú chronickou svalovou slabosťou alebo kardiomyopatiou. Ak sú tieto poruchy nepoznané, bez terapie vedú k významne zvýšenej morbidite a mortalite. Výnimkou nie je ani náhla smrť (22).

Najčastejšia porucha je **MCAD**, ktorá sa najčastejšie klinicky manifestuje medzi 9-18tym mesiacom života (15).

**Terapia je relatívne jednoduchá.** Spočíva v zabránení hladovaniu častou výživou s obmedzením tukov (s jednou až dvoma porciami jedla v noci). Dôležitá je prevencia katabolických stavov a obohatenie stravy o sacharidy. Pri všetkých akútnych katabolických stavoch je nutné intravenózne podávanie maltodextrínov. U LCHAD, VLCAD, CPT I, CPT II, CACT je vhodné podanie MTC oleja (nepotrebuje k vstrebaniu prítomnosť pankreatickej lipázy). U MCAD je MTC olej prísne kontraindikovaný (15,23,24).

## 2.5.2 Organické acidúrie

Organické acidúrie predstavujú skupinu dedičných metabolických ochorení spôsobených poruchou funkcie niektorého z enzýmov zúčastňujúcim sa na katabolizme aminokyselín (21,22). Dôsledkom je hromadenie toxických karboxylových kyselín v telesných tekutinách. Typické je rôzne spektrum klinických prejavov - od ťažkej novorodeneckej formy s metabolickým rozvratom, cez akútnu intermitentnú až po chronickú progresívnu formu.

Medzi najčastejšie organické acidúrie, ktoré v súčasnosti podliehajú plošnému NS, patria leucinóza (choroba javorového sirupu, MSUD) s odhadovanou frekvenciou 1:20 000-50 000 živo narodených detí, izovalerová acidúria (IVA) s frekvenciou 1:50 000 a glutarová acidúria typu I (GA I) s frekvenciou výskytu 1:100 000. MSUD a IVA sú zapríčinené poruchou v metabolizme vetvených aminokyselín (valínu, leucínu, izoleucínu), GA I je

spôsobená poruchou metabolizmu tryptofánu a lyzínu, postihuje hlavne mozog. Všetky ochorenia sú autozomálne recesívne dedičné (22).

**Klinický obraz.** Väčšinou sa prejavujú ako **ťažká novorodenecká forma**. Po rôzne dlho po pôrode trvajúcim bezpríznakovom období dochádza k objaveniu príznakov, ktoré pripomínajú sepsu, príp. meningitídu. Novorodenci odmietajú príjem potravy, sú spaví, majú znížený svalový tonus, apnoické pauzy a môžu upadnúť do kómy, prípadne majú kŕče. Pre **MSUD** je špecifický sladký zápach novorodenca pripomínajúci javorový sirup. Pri **IVA** páchne moč po myšine. Príznaky sú spôsobené hromadením karboxylových kyselín. Tie vedú k metabolickej acidóze, hypoglykémii, hromadeniu laktátu, k hyperamonémii a k zápachu. U pacientov s **GA I** sú prvé príznaky mierne. Je prítomná makrocefália, znížený svalový tonus a opozdený vývoj. Okolo 9.mesiaca u 75% neliečených pacientov hrozí pri katabolickom stave rozvoj „encefalopatickej krízy“(22).

Pri dlhodobom, často nepoznanom priebehu s opakovanými atakami metabolického rozvratu dochádza k rozvoju chronických komplikácií. Jedná sa rôznorodé neurologické príznaky – opozdený psychomotorický vývoj, mikrocefália, poškodenie mozočku a bazálnych ganglií, sekundárna epilepsia. Môže dôjsť ku kardiomyopatii, Reye-like syndrómu a chronickej ľadvinovej nedostatočnosti s poruchou tubulárnych funkcií.

**Terapia** je založená na diéte so zníženým príjmom bielkovín (1,0-1,5g/kg/deň). Dôležitý je dostatočný kalorický príjem aby nedošlo k rozvoju katabolizmu. Je nutná restrikcia prekursorov karboxylových kyselín v diéte. Diéta je dopĺňovaná o zmesi esenciálnych aminokyselín. U **GA I** je vylúčený príjem lyzínu a tryptofánu, u **MSUD** leucínu, izoleucínu a valínu, u **IVA** je nutné zabrániť príjmu leucínu. Pri všetkých organických acidúriách je vhodná suplementácia L-karnitínom, u **IVA** je vhodná suplementácia L-glycínom. U kriticky chorých je na detoxikáciu organizmu nutné použitie eliminačných metód (hemodialýza, hemofiltrácia) (21,22).

**Prognóza** pacientov značne závisí na dobe diagnózy. U **MSUD** je tým lepšia, čím nižšie sú dlhodobé hladiny leucínu. U **GA I** je nesmierne dôležitá prevencia encefalopatických kríz, ktoré sú v 5% smrteľné, v 75% zanechávajú

trvalé následky a v 40% pacienti umierajú predčasne (22). Kvôli dostatočne skorej diagnostike je nesmierne dôležité zavedenie plošného NS pre tieto poruchy.

**Plošný NS** je založený na metóde MS/MS zo suchej krvnej kvapky na filtračnom papieri.

### 3. Zhodnotenie novorodeneckého screeningu v Českej republike

Od založenia prvého plošného novorodeneckého screeningu PKU/HPA v r. 1975 došlo značnému rozvoju PNS.

V tejto kapitole by som pomocou štúdií, ktoré prebehli v rôznych časových obdobiach, chcela prezentovať výsledky PNS v ČR a zamyslieť sa nad efektivitou PNS v ČR.

#### 3.1 *Pojmy súvisiace s hodnotením novorodeneckého screeningu*

**Cut off** – hodnota koncentrácie meraného analytu vo vzorke suchej krvnej kvapky na filtračnom papieri, ktorá jednoznačne určuje *hranicu pre negatívny nález* novorodeneckého screeningu príslušnej choroby. Negatívny výsledok sa nevydáva ani odosielajúcemu pracoviisku, ani rodine. Falošne negatívny výsledok je možný, tak isto ako pri ostatných screeningových biologicko-analytických metódach. Negatívny výsledok neznamená 100% istotu neprítomnosti choroby. Môže značiť prítomnosť klinicky menej závažnej formy ochorenia. Tento poznatok je veľmi dôležitý, aby nedošlo k vylúčeniu danej choroby z diferenciálnej diagnostických úvah pri neskoršom objavení sa príznakov (28).

**Pozitívny nález** – hodnota koncentrácie meraného analytu v suchej krvnej kvapke na filtračnom papieri, ktorá *jednoznačne definuje pozitívny nález* novorodeneckého screeningu pre danú chorobu. Je kontaktovaná rodina a postihnutý jedinec je odoslaný na príslušné klinické pracoviisko k dovyšetreniu. Hodnota negativity („cut off“) a hodnota pozitivity môže byť pre daný vyšetovaný analyt rozdielna. Hodnoty závisia na ďalších parametroch: na veku novorodenca pri odbere vzorky, jeho zrelosti, pôrodnej hmotnosti a na klinickom stave (28).

**Recall** – je daný hodnotou koncentrácie meraného analytu, ktorá sa nachádza medzi hodnotou negativity („cut off“) a hodnotou pozitivity. Výsledok

screeningu je *nejasný*. Je *nutný opakovaný odber* vzorku suchej krvnej kvapky na filtračný papier. Recall *indikuje a zariaďuje screeningové laboratórium* (28).

**Recall rate** – početnosť nutnosti (v %) opakovania screeningového vyšetrenia pre nejasný výsledok (28).

**PPV** – pozitívna prediktívna hodnota („positive predictive value“). Určuje sa vo forme desatinného čísla (0-1). *Pravdepodobnosť s akou pozitívny výsledok značí skutočnú prítomnosť ochorenia*. Je daná podielom definitívne diagnostikovaných prípadov z počtu pozitívne označených prípadov (28).

**Rescreening** – nazývaný tiež „second screening“. Plánovaný a záväzný *druhý odber screeningu*. Je vykonávaný vždy, nezávisle od výsledku prvého screeningu. *Indikuje ho ošetrojúci lekár novorodenca*, informuje o dôvode screeningové laboratórium (28). Indikácie sú uvedené v časti 1.2.2.

### 3.2 Prehľad výsledkov plošného novorodeneckého screeningu

#### 3.2.1 Výsledky screeningu fenylketonúrie/hyperfenylalaninémie

Od zavedenia celoplošného novorodeneckého screeningu PKU/HPA bolo v období od 1975-2001 vyšetrených celkom 3 710 808 novorodencov. U 377 detí bola diagnostikovaná klasická fenylketonúria. Incidencia v tomto období bola 1: 9843 (5).

V období od 1.1 2002–31.12. 2009 bolo vyšetrených celkom 878 127 novorodencov. Klasická fenylketonúria bola diagnostikovaná u 96 novorodencov. Prevalencia je 1: 7969 (28). Detailné hodnoty screenigu PKU sú uvedené v tabuľke.

Laborat.	Počet vyšet. novoroz.	Metóda	Cut off (μmol/L)	Počet záchyto (n)	Prevalen. záchyto	Počet falošne pozit.	PPV	Počet recallov	FPR (%)	Klas. PKU	Mild PKU	nonPKU HPA	Iné HPA	Prev. Klas.+ MildPKU
Praha10	441 939	BI-EIA	120-210	70	1:6313	17	0,805	260	0,063	52	8	3	7	1:7365
Praha2	115 752	MS/MS	120	20	1:5788	15	0,571	166	0,156	18	1	0	1	1:6092
Olomouc	7 903	MS/MS	120	1	1:7903	1	0,500	6	0,088	0	0	0	1	-
Brno	158 867	BI-EIA	120-210	16	1:9929	20	0,444	180	0,126	11	0	5	0	1:14442
Ostrava	153 666	BI-EIA	120-210	19	1:8087	3	0,864	206	0,136	15	1	3	0	1:9604
<b>Celá ČR</b>	<b>878 127</b>			<b>126</b>	<b>1:6704</b>	<b>56</b>	<b>0,692</b>	<b>818</b>	<b>0,104</b>	<b>96</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>1:7969</b>

**Tab. 2 Prehľad výsledkov novorodeneckého screeningu fenylketonúrie za obdobie 1.1.2002 – 31.12. 2009**

*Vysvetlivky:* BI = bakteriálna inhibičná (Guthrieho) metóda; EIA = enzýmoimunoesej; MS/MS = tandemová hmotnostná spektrometria; PPV = pozitívna prediktívna hodnota; FPR = početnosť (%) falošne pozitívnych nálezov; recall rate = početnosť (%) nejasných nálezov vyžadujúcich opakovaný odber suchej krvnej kvapky; Klas. PKU = počet potvrdených klasických prípadov fenylketonúrie (koncentrácia fenylalanínu pri diagnóze >1200  $\mu\text{mol/l}$  + dôkaz mutácie klasickej fenylketonúrie); Mild PKU = počet potvrdených miernych fenylketonúrií (= koncentrácia fenylalanínu pri diagnóze 600 - 1200 $\mu\text{mol/l}$  + dôkaz mutácie pre miernu PKU); nonPKU HPA = počet potvrdených non PKU hyperfenylalaninémii (= koncentrácia fenylalanínu pri dg 120 - 600  $\mu\text{mol/l}$  + dôkaz mutácie pre non PKU HPA); iné HPA = počet iných typov hyperfenylalaninémii, aj tranzitórnych.

*pozn.:* prevalencie boli prepočítané na počet živo narodených (tj. 844 724 novorodencov) v sledovanom období, podľa Ústavu zdravotníckych informáci (MZ ČR).

Zdroj: <http://www.novorozeneckyscreening.cz/index.php?pg=lekari--prehled-vysledku-novorozeneckeho-screeningu-v-cr>

Klinika detí a dorostu, FN Královské Vinohrady, Praha má v súbore 247 pacientov s fenylketonúriou, zachytených pomocou screeningu v rokoch 1970–2001. 53% z nich sú už dospelí. Väčšina dospelých s PKU má voľnejší jedálniček ako detskí pacienti. Zatiaľ chýba dlhodobá skúsenosť s tým, aký má vplyv desaťročia trvajúca hyperfenylalaninémia na zdravotný stav jedincov. Na klinike je sledovaný stav centrálného nervového systému pomocou metód MR (MR a  $^1\text{H}$  MR spektroskopie). Štúdia, ktorá prebehla v rokoch 1992-1998 na Královských Vinohradech v spolupráci s IKEM (Institut klinické a experimentálnej medicíny) na súbore 71 pacientov dokázala, že všetci pacienti s koncentráciou fenylalanínu nad 600  $\mu\text{mol/l}$  majú v MR obraze prítomné ložiská zvýšenej signálovej intenzity pri zadných rohoch komôr. Tieto zmeny nezodpovedajú demyelinizácii (potvrdené  $^1\text{H}$  MR spektroskopiou). Deti aj dospelievajúci sú preto po uvoľnení jedálnička sledovaní longitudinálne pomocou oboch MR metód (5).

### **3.2.2 Výsledky screeningu kongenitálnej hypotyreózy**

Počas obdobia 1985 – 2006 bolo vyšetrených v Českej republike celkovo 1 839 284 novorodencov. Incidencia primárnej sporadickej KH bola 1:4320. Dvakrát častejšie boli postihnutí jedinci ženského pohlavia (2:1). Incidencia vrodeného defektu TBG (thyroxine binding globulin) bola 1:2997 (1985-95). Väčšinou boli postihnutí chlapci (1:9). HLA štúdia odhalila alelu DR6 ako riziková pre deficit TBG. Za obdobie 1985-95 (RIA T4 metóda) boli zistené 3

úniky zo screeningu, ktoré boli diagnostikované podľa klinických príznakov. V apríli 2002 bol zavedený sekundárny screening (= „rescreening“) KH u tých detí, kde by výsledky primárneho screeningu KH mohli byť falošne negatívne (viď 1.2.2). Do konca roku 2006 neboli zachytené žiadne pozitívne prípady sekundárneho screeningu KH (12).

S pomocou ultrazvuku bola v **60%** nájdená **dysgenéza** štítnej žľazy (z toho v 45% prítomný rudiment štítnej žľazy, v 40% hypoplázia štítnej žľazy, v 9% atyreóza a v 6% ektopia štítnej žľazy nájdená pomocou scintigrafie s  $^{99}\text{Tc}$ ). **40%** nálezov na ultrazvuku zodpovedalo normálnej pozícii a veľkosti štítnej žľazy (1,0 – 6,0 ml), jednalo sa o **dyshormonogézu** (12).

Bol zistený súčasný výskyt KH s inými **vrodenými vývojovými vadami**. Vrodené srdečné vady (hlavne septálne defekty) sa vyskytujú 10krát častejšie pri prítomnosti KH, Downov syndróm je 3krát častejší, vrodené vady sluchu sa u pacientov s KH vyskytujú vo frekvencii 1:25. Vrodené vady močového systému (hlavne obštrukcie dolných močových ciest) boli nájdené v 3 zo 60tich ultrazvukových nálezov (12).

150 detí s primárnou kongenitálnou hypotyreózou bolo dlhodobo sledovaných na Klinike dĕtí a dorostu vo FNKV. Pacienti boli liečení L-tyroxínom, iniciálnou dávkou 10-15  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{deň}$ . Neboli zistené odchytky v somatickom vývoji (hmotnosť a rast). Psychomotorický vývoj u 5-6 ročných detí zodpovedal v priemere **IQ 103** (hodnotený Wechslerovými inteligenčnými testami pre predškolské deti). **60% ťažkých kongenitálnych hypotyreóz** (aplázia štítnej žľazy, kompletná dyshormonogéza) bolo spojených s **prítomnosťou symptómov ľahkej mozgovej dysfunkcie** s opozdeným gestačným kostným vekom, prechodným perikardiálnym výpotkom a poruchami svalového tonu. U týchto detí je **dôležité zahájiť skorú rehabilitačnú liečbu** (11,12).

37 pacientov s dyshormonogézou bolo dlhodobo sledovaných pomocou ultrazvuku. V 16tich prípadoch štítna žľaza postupne atrofovala, u dvoch dospievajúcich chlapcov boli zistené multinodulárne strumy. Obe boli odoperované (v jednej bolo podľa cytológie podozrenie na karcinóm, druhá bola obrovského objemu – 67 ml) (12).



Ultrazvukové sledovanie 91 pacientov s dysgenézou prinieslo tieto výsledky: u 18 pacientov z 29, ktorí boli vedení pod diagnózou hypoplázie štítnej žľazy, boli postupne odhalené rudimenty. Zo 62 pacientov s rudimentami štítnej žľazy boli po rokoch nájdené cystoidy v 20 prípadoch (12).

Od roku 1996 (po zavedení TSH screeningovej metódy) je monitorované jodidové zásobenie novorodeneckej populácie. Aby bola dodávka jódu považovaná za normálnu, TSH v rozmedzí 5,0 – 20,0 mIU/L by nemala prekročiť 3%. V roku 2001 bola priemerná hodnota v ČR 4,9% (11). **Od roku 2006 je jodidové zásobenie novorodeneckej populácie v norme** (12,13). Od októbra 2009 boli novou vyhláškou zavedené skoršie odbery suchej krvnej kvapky, ktoré ovplyvňujú hodnoty TSH. Tie sú po pôrode prechodne zvýšené. Bude nutné zmeniť hranicu pre označenie normálnej jódovej dodávky oproti predchádzajúcim hodnotám (13).

V období 2002-2009 bolo celkovo vyšetrených 860 981 novorodencov. Permanentná sporadická KH bola zachytená v 211 prípadoch, tranzitorná KH v 26 prípadoch. Incidencia v sledovanom období je 1:4003 (28). Ďalšie hodnoty plošného novorodeneckého screeningu KH sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Laboratórium	Počet vyšetrených novorodencov	Metodika (TSH)	Cut off (mIU/L)	Počet záchyto (n)	Prevalencia záchyto (n)	Falošná pozitivita (n)	PPV	FPR (%)	Potvrdené permanent. KH	Tranzitorné KH	Prevalencia permanent. KH
Praha 10	542 736	autoDelfia	15	130	1:4175	144	0,474	0,027	125	5	1:4337
Brno	318 245	Delfia	15	107	1:2974	230	0,318	0,072	86	21	1:3701
<b>Celá ČR</b>	<b>860 981</b>			<b>237</b>	<b>1:3633</b>	<b>374</b>	<b>0,388</b>	<b>0,043</b>	<b>211</b>	<b>26</b>	<b>1:4003</b>

**Tab. 3 Prehľad výsledkov novorodeneckého screeningu kongenitálnej hypotyreózy za obdobie 1.1.2002 – 31.12.2009**

*Vysvetlivky:* (auto)Delfia = flouoroimunoesej; PPV = pozitívna prediktívna hodnota; FPR = počet (%) falošne pozitívnych nálezov; KH = kongenitálna hypotyreóza.

*Pozn.:* V prípade novorodeneckého screeningu KH neexistuje možnosť opakovaného odberu pri nejasnom výsledku (tzn. „recall“ a „recall rate“). Všetky pozitívne nálezy nad hranicou „cut off“ sú posielané na špeciálne klinické pracoviská, kde sa potvrdí alebo vylúči diagnóza. Pozitívne nálezy zahŕňujú skutočné permanentné hypotyreózy a tranzitorné hypotyreózy, pre ktoré je skorá liečba taktiež prínosná.

Zdroj: <http://www.novorozeneckyscreening.cz/index.php?pg=lekari--prehled-vysledku-novorozeneckeho-screeningu-v-cr>

### 3.2.3 Výsledky screeningu kongenitálnej adrenálnej hyperplázie

Pred zahájením novorodeneckého screeningu CAH v r. 2006 bola overovaná jeho potreba viacerými štúdiami. Pred samotnou pilotnou štúdiou bola zahájená retrospektívna štúdia v stredoeurópskom regióne (35 miliónov obyvateľov v ČR, Maďarsku, Slovinsku, Slovensku a Rakúsku), aby bolo eliminované riziko „malých čísel“ pri hodnotení celého súboru. Boli analyzované dáta 484 pacientov s klasickou formou CAH, diagnostikovanou v rokoch 1969 – 1998. Počet chlapcov v tejto skupine bol signifikantne nižší (43%) ako počet dievčat (57%). Pri autozómálne recesívnom prenose by mal byť pomer pohlaví 1:1. Je možné predpokladať, že chýbajúci chlapci zomreli bez stanovenia diagnózy. Diagnóza u chlapcov bola stanovená signifikantne pozdejšie (2krát väčší medián veku stanovia diagnózy u chlapcov ako u dievčat). Z 231 súrodencov pacientov zomrelo 16 v kojeneckom veku bez diagnózy CAH. Kojenecká úmrtnosť tu dosahuje 7% - je signifikantne vyššia ako v bežnej populácii (27).

Pilotná štúdia prebehla v období od 1.1.-31.12. 2001 v spáde FNKV. 26502 chlapcom bola odobraná vzorka suchej krvnej kvapky a vyšetrená na prítomnosť 17-OHP metódou DELFIA. 55 z 25 071 chlapcov (pôrodná hmotnosť >2500g) malo hladinu 17-OHP >30 nmol/l, recall rate 0,219%. Jasne pozitívne prípady s hladinou 17-OHP >90 nmol/l boli nájdené v siedmich prípadoch. V troch prípadoch bola definitívne klinicky potvrdená diagnóza CAH (1 SV, 2 SW formy). PPV bola 0,43. Bola dokázaná efektivita a potvrdená zrealizovateľnosť screeningu CAH (30).

V priebehu roka 2006 (prvý rok celoplošného novorodeneckého screeningu CAH) bolo vyšetrených celkovo 67 267 novorodencov. Incidencia bola 1:8408. Pomer dievčat ku chlapcom bol 1:7. Bol predpoklad, že vyššia incidencia u chlapcov sa upraví s vyšším počtom vyšetrených novorodencov. Problémom bola vysoká hodnota „recall rate“, hlavne u predčasne narodených. Medián veku stanovenia diagnózy SW formy bol 8 dní. Ani jeden prípad SW formy sa klinicky nemanifestoval (12).

Ďalšie hodnoty plošného novorodeneckého screeningu CAH sú uvedené v nasledujúcich tabuľkách.

Laboratór.	Počet vyšetř. novorod.	Metodika (17-OHP)	Cuf off (nmol/L)	Počet záchytov (n)	Prevalen. záchytov	Počet falošne pozitivnych (n)	PPV	Počet recallov	Prevalen. recallov	FPR (%)	Falošná negat. (n)	Prevalencia CAH
Praha10	291427	AutoDelfia	40	22	1:13246	32	0,407	1504	1:194	0,527	2	1:12143
Brno	136252	Delfia	40	15	1:9084	42	0,263	748	1:182	0,579	0	1:9084
<b>Celá ČR</b>	<b>427679</b>			<b>37</b>	<b>1:11311</b>	<b>74</b>	<b>0,333</b>	<b>2252</b>	<b>1:186</b>	<b>0,555</b>	<b>2</b>	<b>1:10731</b>

**Tab. 4** Prehľad výsledkov novorodeneckého screeningu kongenitálnej adrenálnej hyperplázie od jeho celoplošného zahájenia (Praha 10 od 7.2.2006, Brno od 1.11.2006) do 31.12.2009

Vysvetlivky: (auto)Delfia = fluoroimunoesej; 17-OHP = 17-hydroxyprogesterón (hodnota cut off je závislá na pôrodnej hmotnosti, veku pri odbere a type použitého kitu); počet záchytov = počet jedincov označených screeningom ako pozitívny, odoslaní na klinické pracovisko s potvrdeniu alebo vylúčeniu diagnózy; počet falošne pozitivnych = počet záchytov – počet potvrdených diagnóz; PPV = pozitívna prediktívna hodnota; počet recallov = počet nejasných nálezov vyžadujúcich opakovaný odber vzorku suchej krvnej kvapky; FPR = početnosť (v %) falošne pozitivnych nálezov s počtom recallov; CAH = kongenitálna adrenálna hyperplázia

Zdroj: <http://www.novorozeneckyscreening.cz/index.php?pg=lekari--prehled-vysledku-novorozeneckeho-screeningu-v-cr>

	Praha	Brno	Celá ČR
<b>Celkový počet zachytených pacientov:</b>	22 (15 ♂)	15 (8 ♂)	<b>37 (23 ♂)</b>
z toho forma CAH: SW	7 (3 ♂)	3 (2 ♂)	<b>10 (5 ♂)</b>
SW/SV	10 (9 ♂)	5 (3 ♂)	<b>15 (12 ♂)</b>
SV	2 (2 ♂)	5 (2 ♂)	<b>7 (4 ♂)</b>
SV/LO	3 (1 ♂)	2 (1 ♂)	<b>5 (2 ♂)</b>
<b>Falošná negativita:</b>	2 (0 ♂) SW/SV	-	<b>2 (0 ♂) SW/SV</b>
<b>Celkom CAH pacientov:</b>	24 (15 ♂)	15 (8 ♂)	<b>39 (23 ♂)</b>
<b>Falošná pozitivita:</b>	32	42	<b>74</b>
z toho heterozygóti	5	0	<b>5</b>

**Tab. 5** Prehľad skupiny pacientov s kongenitálnou adrenálnou hyperpláziou od zahájenia celoplošného novorodeneckého screeningu v r. 2006 do 31.12.2009.

Vysvetlivky: ♂ = počet chlapcov z celkového počtu postihnutých; SW = salt wasting (najťažší fenotyp so soľnou poruchou, aktivita enzýmu 21-hydroxylázy je nulová); SW/SV = stredne ťažký fenotyp, prechodná forma medzi soľnou poruchou a iba virilizujúcou formou, aktivita enzýmu 1-2%; SV = simple virilizing (stredne ľahký fenotyp, aktivita enzýmu 1-5%); SV/LO = ľahký fenotyp, prechodná forma medzi iba virilizujúcou formou a neklasickou „late onset“ formou, aktivita enzýmu >5%.

Zdroj: <http://www.novorozeneckyscreening.cz/index.php?pg=lekari--prehled-vysledku-novorozeneckeho-screeningu-v-cr>

	Praha	Brno	Celá ČR
<b>Počet novorodencov s 2500g a viac</b>	264 937*	124 075*	<b>389 012*</b>
Počet recallov	756	261	<b>1017</b>
Prevalencia recallov	1:350*	1:475*	<b>1:383</b>
<b>Počet novorodencov do 2500g</b>	20242*	9256*	<b>29498*</b>
Počet recallov	748	487	<b>1235</b>
Prevalencia recallov	1:27*	1:19*	<b>1:24*</b>

**Tab. 6** Rozbor recallov v závislosti na pôrodnej hmotnosti v NS CAH od jeho celoplošného zahájenia v r. 2006 do 31. 12. 2009

Vysvetlivky: \* = vzťahuje sa na počet živo narodených v sledovanom období (tj. 418 510 novorodencov) podľa Ústavu zdravotníckych informácií MZ ČR.

Zdroj: <http://www.novorozeneckyscreening.cz/index.php?pg=lekari--prehled-vysledku-novorozeneckeho-screeningu-v-cr>

### 3.2.4 Výsledky screeningu cystickej fibrózy

Pred začlenením cystickej fibrózy do celoplošného novorodeneckého screeningu bola skúmaná nutnosť zavedenia screeningu CF. Skorá diagnóza CF, tzn. do prvých dvoch mesiacov života, je spojená s lepšou prognózou a významne znižuje úzkosť rodičov v súvislosti s pozdným stanovením diagnózy. V Českej Republike bolo v rokoch 1999-2004 zistené významné oneskorenie v stanovení diagnózy CF na základne klinických príznakov. Dôvodom je pravdepodobne rozširujúca sa decentralizácia zdravotníckej starostlivosti, ktorá viedla k zhoršeniu starostlivosti o pacientov vyžadujúcich špeciálny prístup (20).

Pilotná štúdia pre NS CF prebehla v období 1.2.2005 – 1.11.2006. Vyšetrovací algoritmus bol navrhnutý podľa schémy IRT/DNA/IRT. Bolo vyšetrených 76 438 novorodencov z celkového počtu 119 028 (64, 1%) narodených v oblasti referenčného regiónu (západná časť ČR). Pomocou štúdie bolo odhalených 799 jedincov, ktorí mali hodnotu IRT nad „cut off“ a boli odoslaní k DNA testovaniu. V jedenástich prípadoch bola potvrdená CF. Medián veku stanovenia diagnózy bol 37 dní (26 – 54 dní). Incidencia bola 1:6946 živo narodených. Pilotná štúdia potvrdila potrebu a dokázala zrealizovateľnosť NS CF v ČR (20).

Od zahájenia celoplošného novorodeneckého screeningu CF 1.10. 2009 do konca roku 2009 bolo vyšetrených celkovo 21 617 novorodencov. Boli potvrdené štyri prípady CF. Prevalencia CF je 1: 5040 (28). Ďalšie hodnoty plošného novorodeneckého screeningu sú uvedené v tabuľke.

Laboratór.	Počet vyšetř. novorod.	Metodika (IRT)	Cut off (ng/mL)	Počet MG	Počet recallov	Počet PT	Počet heterozyg.	Potvrđ. dg.	Preval. záchyťov	Preval. recallov	FPR (%) potné testy	PPV	Faloš. negat.	Preval. CF
Praha 10	18075	AutoDelfia	65	240	4	5	2	3	1:6025	1:4519	0,011	0,600	0	1:6025
Brno	3542	Delfia	65	36	0	5	4	1	1:3542	0	0,113	0,200	0	1:3542
Celá ČR	21617			276	4	10	6	4	1:5040	1:5404	0,028	0,400	0	1:5040

**Tab. 7** Prehľad výsledkov novorodeneckého screeningu cystickej fibrózy od jeho celoplošného zahájenia (Praha 10 od 1.10.2009, Brno 1.12.2009) do 31.12.2009

Vysvetlivky: (auto)Delfia = flouoroimunoesej; IRT = imunoreaktívny trypsinogén; MG = molekulárne genetická analýza CFTR génu; PT = potný test; PPV = pozitívna prediktívna hodnota; FPR = početnosť (v %) falošne pozitívnych prípadov (potných testov s negatívnym nálezom); CF = cystická fibróza  
Zdroj: <http://www.novorozeneckyscreening.cz/index.php?pg=lekari--prehled-vysledku-novorozeneckeho-screeningu-v-cr>

### 3.2.5 Výsledky screeningu dedičných porúch metabolizmu

V období od zahájenia celoplošného novorodeneckého screeningu dedičných porúch metabolizmu (porúch oxidácie mastných kyselín a organických acidúrií), od 1.10. 2009 do 31.12.2009, bolo vyšetrených celkovo 125 193 novorodencov. Pomocou screeningu boli odhalené 2 choroby: 1 choroba javorového sirupu (MSUD) a jeden deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom (MCAD) (28).

### 3.3 Efektivita novorodeneckého screeningu v Českej Republike

Pri položení si otázky, či je novorodenecký screening v Českej Republike efektívny si musíme najprv zodpovedať, aké sú hodnoty senzitivity a špecifičnosti používaných screeningových testov. Parametre hodnôt „cut off“ limitu, „recall-rate“, falošnej pozitivity a falošnej negativity sú hlavnými merítkami vierohodnosti screeningu (sú uvedené v tabuľkách 2-7) (28).

**Senzitivita** je schopnosť testu *zachytiť určitý stav*. Udáva pravdepodobnosť pozitívneho výsledku u pacientov s chorobou. Môžeme ju vypočítať podľa vzorca  $TP/(TP + FN)$ . TP značí počet pravdivo pozitívnych, FN počet falošne negatívnych prípadov.

**Špecifičnosť** je schopnosť testu reagovať *negatívne*, pokiaľ uvedený stav *nie je prítomný*. Udáva pravdepodobnosť negatívneho výsledku u pacientov bez choroby. Je možné ju vypočítať podľa vzorca  $TN/(TN + FP)$ . TN označuje počet pravdivo negatívnych, FP počet falošne pozitívnych prípadov.

Hodnoty TP, FP, TN a FN značne závisia na nastavení hladiny limitu „cut off“. Pri zníženej hodnote „cut off“ sú zachytené všetky pozitívne prípady, je eliminovaná falošná negativita. Rastie však počet falošne pozitívnych prípadov. Použitie zníženej hodnoty „cut off“ je vhodné pri vyhľadávaní chorôb, ktoré sú ľahko liečiteľné.

Pri zvýšenej hodnote „cut off“ rastie falošná negativita, zároveň však klesá počet falošne pozitívnych. Používa sa pri vyhľadávaní chorôb s veľmi náročnou a riskantnou liečbou (23).

### 3.3.1 Senzitivita a špecifičnosť novorodeneckých screeningov

V období **2002-2009** bolo zachytených pomocou **screeningu fenylnketonúrie/hyperfenylalaninémie** 126 klinicky potvrdených prípadov PKU/HPA. 56 prípadov bolo falošne pozitívnych, celkovo bolo vyšetrených 878 127 novorodencov. Nebol zachytený žiadny prípad falošnej negativity. **Senzitivita** plošného novorodeneckého screeningu PKU/HPA je **100,0%**. **Špecifičnosť** screeningu je **99,99%**.

Plošný novorodenecký screening **kongenitálnej hypotyreózy** zachytil v sledovanom období **2002-2009** 237 pozitívnych a klinicky potvrdených prípadov. Celkovo bolo vyšetrených 860 981 novorodencov, 374 prípadov bolo falošne pozitívnych. Nebol zaznamenaný žiadny prípad falošnej negativity. **Senzitivita** plošného novorodeneckého screeningu KH je **100.0%**. **Špecifičnosť** je **99,96%**.

**Kongenitálna adrenálna hyperplázia** bola zachytená v období od založenia plošného novorodeneckého screeningu v roku **2006** do roku **2009** v 37 prípadoch. Bolo vyšetrených celkovo 427 679 novorodencov, 74 prípadov bolo falošne pozitívnych. Falošná negativita nebola zaznamenaná. **Senzitivita** plošného novorodeneckého screeningu CAH je 100,0%. **Špecifičnosť** je **99,98%**.

Plošný novorodenecký screening **cystickej fibrózy** a **dedičných porúch metabolizmu** aminokyselín (okrem PKU/HPA) a mastných kyselín prebieha od 1.10. 2009. Je to príliš krátka doba na to, aby bolo možné zhodnotiť senzitivitu či špecifičnosť používaných screeningových testov. Prebehnuté pilotné štúdie pre plošný novorodenecký screening cystickej fibrózy a pre dedičné poruchy metabolizmu vybraných aminokyselín a mastných kyselín však dokázali, že PNS je pre tieto poruchy potrebný, zrealizovateľný a dostatočne efektívny.

### **3.3.2 Ekonomický pohľad na plošný novorodenecký screening**

Každý jeden novorodenec má pravdepodobnosť asi 1:1150, že bude trpieť jednou zo screenovaných porúch. Finančné náklady zdravotných poisťovní na systém novorodeneckého screeningu predstavujú 746,- Kč na jedného novorodenca. Bolo dokázané, že pri liečbe komplikácií, spojených s neskorou diagnostikou danej choroby, ktorá podlieha plošnému novorodeneckému screeningu, sú náklady na liečbu mnohonásobne vyššie. Z ekonomického hľadiska je novorodenecký screening výhodný (28).

## Záver

Plošný novorodenecký screening v Českej Republike preukázal svoju vysokú organizačnú, medicínsku a ekonomickú efektívnosť.

V období 2002-2009 (prípadne od zahájenia daného novorodeneckého screeningu do roku 2009) majú používané screeningové testy 100% senzitivitu a špecifickosť, ktorá preyšuje 99,95%. Svedčí to o citlivo zvolených hladinách „cut off“ limitov. Pozitívna prediktívna hodnota screeningových testov sa pohybuje v rozmedzí od 0,333 (NS CAH) do 0,692 (NS PKU/HPA). Vyššia incidencia recallov pri novorodeneckom screeningu CAH je spojená s nižšou pôrodnou hmotnosťou novorodencov.

Dlhodobé sledovanie pacientov, ktorí boli diagnostikovaní pomocou programu plošného novorodeneckého screeningu dokázalo, že skorá a účinná liečba dokáže zabrániť prejavom choroby a komplikáciám z nej vyplývajúcich. Somatický aj psychomotorický vývoj bol u sledovaných pacientov porovnateľný s vývojom normálnej populácie. Prípadným odchýlkam je možné zabrániť skorou rehabilitáciou. Celoživotné sledovanie pacientov je nutnosťou, ktorá zabezpečuje dozor nad zdravotným stavom pacienta a nastavenou liečbou.

Plošný novorodenecký screening je výhodný aj z ekonomického hľadiska. Náklady vynaložené zdravotnými poisťovňami na systém plošného novorodeneckého screeningu sú mnohonásobne nižšie, ako náklady, ktoré by boli vynaložené na liečbu komplikácií spojených s neskorou diagnostikou daných chorôb.



## Súhrn

Plošný novorodenecký screening zo suchej krvnej kvapky má za cieľ aktívne a systematicky vyhľadávať niektoré vrodené choroby u všetkých novorodencov. Vyhľadáujú sa tie vrodené choroby, ktoré sú po narodení v bezpríznakovom štádiu, alebo ich príznaky sú ľahko prehliadnuteľné. Klinické prejavy vrodených porúch sa objavujú často až po pominutí kritickej periódy, v ktorej bola porucha reverzibilná. PNS umožňuje skorú diagnostiku a liečbu. Zabráňuje trvalým a neliečiteľným následkom choroby, hlavne na úrovni centrálného nervového systému. Zamedzuje akútnym stavom, ktoré ohrozujú jedinca na živote.

PNS je od svojho založenia v Českej Republike v roku 1975 veľmi úspešným nástrojom sekundárnej prevencie. Od 1.10. 2009 medzi vyhľadávané poruchy patria: fenyketonúria/hyperfenylalaninémia, kongenitálna hypotyreóza, kongenitálna adrenálna hyperplázia, cystická fibróza, leucinóza, deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom (MCAD), deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín s veľmi dlhým reťazcom (VLCAD), deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín s dlhým reťazcom (LCHAD), deficit karnitínpalmitoiltransferázy I (CPT I), deficit karnitínpalmitoiltransferázy II (CPT II), deficit karnitínacylkarnitíntranslokázy (CACT), glutarová acidúria typ I (GA I) a izovalerová acidúria (IVA).

Dlhodobé sledovanie pacientov, ktorí boli diagnostikovaní pomocou PNS, potvrdilo značný medicínsky a ekonomický prínos preventívneho programu. Používané laboratórne metódy majú vysoké hodnoty senzitivity a špecifčnosti.

## Summary

The aim of mass neonatal screening from dry blood spot is to systemically and actively identify specific congenital disorders in all the newborns. Inborn conditions being screened are either without clinical symptoms in early postnatal period, or the symptoms are easily overlooked. The onset of symptoms is often past the critical time when clinical damage was reversible. Mass neonatal screening enables early diagnostics and intervention. Screening prevents morbidity associated with these conditions, especially concerning central nervous system. It avoids the manifestations of acute crises, which may lead to the death of patients.

Mass newborn screening has been a very successful preventive program to be initiated in the Czech Republic in 1975. Since 1.10. 2009 the neonatal screening in the Czech Republic encompasses these conditions: phenylketonuria/hyperphenylalaninemia, congenital hypothyroidism, congenital adrenal hyperplasia, cystic fibrosis, maple syrup urine disease, medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, long-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency, carnitine palmitoyl transferase deficiency I, carnitine palmitoyl transferase deficiency II, carnitine/acylcarnitine translocase deficiency, glutaric aciduria I and isovaleric acidemia.

Longitudinal follow-up of patients diagnosed by the methods of mass newborn screening has confirmed its extensive medical and economical benefit. Laboratory tests used for the screening have high values of sensitivity and specificity.

## Zoznam použitej literatúry

1. BLEHOVÁ B., et.al. *Oligofrenie a demence v pediatrické praxi*. 2.vyd. Praha : Avicenum, 1978. 264 s.
2. DUSSAULT J. H. The Anecdotal History of Screening for Congenital Hypothyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* [online]. 1999, Vol. 84, No. 12 [cit. 2009-11-23] Dostupné z: <http://jcem.endojournals.org/cgi/reprint/84/12/4332> ISSN: 4332-4334.
3. *Fakultní nemocnice Královské Vinohrady* [online]. 2009 [cit. 2009-12-03]. Dostupné z: <http://www.fnkv.cz/>.
4. HARDIN J., et.al. Whole genome microarray analysis, from neonatal blood cards. *BMC Genetics* [online]. 2009, Vol. 10, No. 38 [cit. 2009-11-28] Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/10/38> doi:10.1186/1471-2156-10-38.
5. HEJCMANOVÁ L. Sedmadvacet let novorozeneckého skríninku fenylketonurie v ČR. *Časopis lékařů českých*. 2002, roč. 141, č. 23, s. 748.
6. HNÍKOVÁ O., KRAČMAR P. *Kongenitální hypotyreóza. Hálkova sbírka pediatrických prací 41*. 1. vyd. Praha : Avicenum, 1989. 102 s. ISBN 08-009-89.
7. HNÍKOVÁ O. Kongenitální hypotyreóza. *Pediatric pro praxi* [online]. 2005, číslo 3 [cit. 2009-12-3]. Dostupné z: [http://www.solen.sk/index.php?page=pdf\\_view&pdf\\_id=732&magazine\\_id=4](http://www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=732&magazine_id=4).
8. HNÍKOVÁ O. Kongenitální hypotyreóza. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2005, číslo 4 [cit. 2009-12-3]. Dostupné z: <http://www.solen.cz/pdfs/int/2005/04/10.pdf>.
9. HNÍKOVÁ O. Novorozenecký screening kongenitální hypotyreózy na území ČSFR (1985-1992) – epidemiologická studie. *Československá Pediatrie*. 1994, roč. 49, č. 6, s. 323 – 327.
10. HNÍKOVÁ O., KRAČMAR P. Epidemiology of Congenital Hypothyroidism in Bohemia. In *Early fetal diagnosis: Recent Progress and Public Health Implications*. Praha : Karolinum-Charles University Press, 1992. s. 66.

11. HNÍKOVÁ O. Neonatální screening kongenitální hypotyreozy v ČR (výsledky a perspektivy). *Časopis lékařů českých*. 2002, roč. 141, č. 23, s. 747-748.
12. HNÍKOVÁ O., et.al. Preventive Approaches to Endocrinopathies in the Czech Republic. In *Abstract book: 46th Annual Meeting ESPE 2007*. Helsinki : 2007. p. 83.
13. HNÍKOVÁ O., KRAČMAR P., VINOHRADSKÁ H. Plodová hypothyroxinémie a neonatální TSH. In *Sborník IX. konference u příležitosti Dne jódu*. Praha : Státní zdravotní ústav, 2010. s. 11.
14. HNÍKOVÁ O. Vrozené poruchy štítné žlázy. In LEBL J., ZAPLETALOVÁ J., KOLOUŠKOVÁ S. *Dětská endokrinologie. Edice Trendy soudobé pediatrie, svazek 3*. 1.vyd. Praha : Galén, 2004. 479 s. ISBN 80-7262-250-1.
15. HOFFMANN G. F., et.al. *Dědičné metabolické poruchy*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, a.s., 2006. 416 s. ISBN 80-247-0831-0.
16. HRODEK O., VAVŘINEC J., et.al. *Pediatrie*. 1.vyd. Praha : Galén, 2002. 767 s. ISBN 80-7262-178-5.
17. HYÁNEK J. Z historie prevence, diagnostiky a léčby dědičných metabolických poruch v Praze (milistínske vzpomínky). *Brožura 50 let České společnosti klinické biochemie* [online]. 2008, 1. vyd. [cit 2009-12-10]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/50let/Hyanek.pdf> .
18. LEAO L. L., DE AGUIAR M. B. Newborn screening: what pediatricians should know. *Jornal de Pediatria* [online]. 2008, Vol. 84, No. 4 [cit. 2009-11-27]. Dostupné z: <http://www.jpmed.com.br/conteudo/08-84-S80/ing.pdf> doi: 102223/JPED.1790.
19. LEBL J., PROVAZNÍK K., HEJCMANOVÁ L. *Preklinická pediatrie*. 1. vyd. Praha : Galén, 2003. 248 s. ISBN 80-7262-207-2.
20. MACEK M. Jr., VOTAVA F., et.at. Pilot newborn screening project for cystic fibrosis in the Czech Republic: Defining role of the delay in its symptomatic diagnosis and influence of ultrasound-based prenatal diagnosis on the incidence of the disease. *Journal of Cystic Fibrosis* [online]. May 2009, Vol. 8, No. 3, Pages 224-227 [cit 2009-12-6].

- Dostupné z: [http://www.cysticfibrosisjournal.com/article/S1569-1993\(09\)00004-6/abstract](http://www.cysticfibrosisjournal.com/article/S1569-1993(09)00004-6/abstract) DOI: 10.1016/j.jcf.2009.01.002).
21. Medicabaze.cz - lékařské repetitorium online. Organické acidurie – leucinóza, izovalerová acidurie, propionová acidurie, metylmalonová acidurie. [online]. 2007 [cit 2009-12-10] Dostupné z: [http://www.medibaze.cz/index.php?sec=term\\_detail&termId=2380](http://www.medibaze.cz/index.php?sec=term_detail&termId=2380).
  22. Národní sdružení PKU a jiných dědičných metabolických poruch [online]. 2009 [cit. 2009-12-10] Dostupné z: <http://www.nspku.cz/>.
  23. SAHAI I., MARSDEN D. Newborn screening. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science* [online]. March 2009, Vol. 46, No. 2, Pages 55-82 [cit 2009-11-25]. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/10408360802485305> ISSN: 1549-781X online.
  24. ŠAŠINKA M., ŠAGÁT T. *Pediatrica II. zväzok*. 1. vyd. Košice : Satus s.r.o., 1998. 1156 s. ISBN 80-967963-0-5.
  25. ŠŤASTNÁ S., CHRASTINA P. Tandemová hmotnostní spektrometrie – zásadní změna v novorozeneckém screeningu dědičných metabolických poruch. *Vox paediatricae* [online]. březen 2006, roč.6, č.3 [cit. 2009-12-4] Dostupné z: [http://www.linda-linie.cz/cps/rde/xbcr/zc/vox\\_03\\_2006.pdf](http://www.linda-linie.cz/cps/rde/xbcr/zc/vox_03_2006.pdf). ISSN: 1213-2241.
  26. Věstník MZ ČR, Částka 6/2009 : Metodický návod k zajištění celoplošního laboratorního novorozeneckého screeningu a následné péče [cit. 2009-12-9] Dostupné z: [http://www.udmp.cz/ns/ns\\_files/6\\_2009.pdf](http://www.udmp.cz/ns/ns_files/6_2009.pdf).
  27. VOTAVA F. Proč provádět novorozenecký skrínink kongenitální adrenální hyperplazie? *Časopis lékařů českých*. 2002, roč. 141, č. 23, s. 748.
  28. VOTAVA F., et.al. Novorozenecký screening [online]. Institut biostatistiky a analýz, 2009 [cit. 2010-02-20]. Dostupné z: <http://www.novorozeneckyscreening.cz/>.
  29. VOTAVA F. *Novorozenecký screening kongenitální adrenální hyperplazie. Disertační práce*. Praha 2005.

- 30.** VOTAVA F., et.al. Novorozenecký screening kongenitální adrenální hyperplazie v České republice: výsledky roční pilotní studie u chlapců. *Československá pediatrie*. 2002, roč. 57, č. 12, s. 690-696.
- 31.** WALD N., LECK I. *Antenatal and neonatal screening*. 2.ed. Oxford : Oxford University Press, 2000. 591 p. ISBN 0-19-262826-7.