

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

**Laboratorní vyšetřovací metody v těhotenství zaměřené na screening
vrozených vývojových vad plodu**

Bakalářská práce

Autor práce: Jana Spourová
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Miloš Velemínský, Ph.D.

Datum odevzdání práce: 13. 8. 2012

Abstrakt

Ve své bakalářské práci se zabývám screeningovými vyšetřovacími metodami v těhotenství, které jsou zaměřeny na odhalení rizika vrozených vývojových vad. Jde o soubor vyšetření kombinující laboratorní stanovení biochemických markerů v mateřském séru s parametry ultrazvukového screeningu. V prvním a časných fázích druhého trimestru se vyšetřuje plazmatický protein A a volná beta podjednotka choriového gonadotropinu. Vyšetření se kombinuje s ultrazvukovým vyšetřením nuchální translucence. Ve druhém trimestru těhotenství, nejčastěji v 15.-17. týdnu těhotenství se skládá ze stanovení alfafetoproteinu a choriového gonadotropinu, někdy navíc s nekonjugovaným estriolem. V laboratoři klinické biochemie Městské nemocnice Privamed v Plzni jsem naměřila 60 vzorků mateřského séra pro screening v prvním trimestru a 60 vzorků pro screening ve druhém trimestru. Všechny vzorky jsem vyhodnocovala ve spolupráci s laboratoří Genetiky Plzeň s.r.o. v softwaru Alpha, který zpracovává zadané hodnoty biochemických markerů, hodnoty měřené ultrazvukem a klinická data pacientky. Z 60 vzorků pro prvotrimestrový screening byly 2 pozitivní na trizomii 21. chromozomu a 1 na trizomii 18. chromozomu, zbylých 57 bylo negativních. Z 60 pro screening ve druhém trimestru 3 vzorky pozitivní na trizomii 21. chromozomu a 2 na defekty neurální trubice. Pozitivní screening však neznamená přítomnost vady, jen zvýšené riziko výskytu. Ženám s pozitivním výsledkem screeningu je zpravidla nabídnuta některá z metod prenatalní diagnostiky, k jejichž provedení je nutný odběr plodové vody nebo choriových klků, který je pro ženu invazivní. Prenatální diagnostika je zaměřena především na určení karyotypu plodu.

Abstract

In my bachelor's thesis, I deal with screening examination methods in pregnancy, focusing on revealing the risk of congenital developmental anomalies. It is a complex of examinations combining the laboratory determination of biochemical markers in the maternal serum with parameters of ultrasound screening. In the first and early stages of the second trimester the plasma protein A and a free beta sub-unit of chorionic gonadotropin is examined. The examination is combined with the ultrasound examination of nuchal translucency. In the second trimester of pregnancy, most often in the 15-17th weeks of the pregnancy it consists of the determination of alpha-fetoprotein and chorionic gonadotropin, sometimes moreover with the non-conjugated estriol. In the laboratory of the clinical biochemistry Privamed of the Municipal Hospital in Plzeň I measured 60 samples of maternity serum for screening in the first trimester and 60 samples for screening in the second trimester on the Roche Elecsys 2010 appliance. I evaluated all the samples in the co-operation with the laboratory for Genetics Plzeň s.r.o. in Alpha software, processing the entered values of biochemical markers, the values measured by the ultrasound and the clinical data of the patient. Out of 60 samples for the first trimester screening, 2 were positive for trisomy of the 21st chromosome and 1 for trisomy of the 18th chromosome, the remaining 57 were negative. Out of 60 for screening in the second trimester, 3 samples were positive for trisomy of the 21st chromosome and 2 for the defects of the neural tube. The positive screening, however, does not mean the presence of the defect, only the increased risk of occurrence. The woman with the positive result of screening are being offered mostly one of the methods of the prenatal diagnostics, for the performance of which taking the amniotic fluid or chorionic villus is necessary, which is invasive for the woman. Prenatal diagnostics focuses first of all on the determining the karyotype of foetus.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval (a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 13.8.2012

.....

Jana Spourová

Poděkování

Děkuji MUDr. Haně Králové z biochemické laboratoře Městské nemocnice Privamed a.s. Plzni za umožnění provedení praktické části práce, dále děkuji Mgr. Sabině Planetové a paní Evě Kohoutové z laboratoře Genetiky Plzeň s.r.o. za pomoc s vyhodnocováním výsledků a seznámení s genetickými metodami. Dík patří i MUDr. Miloši Velemínskému, Ph.D za vedení práce a cenné rady.

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
Úvod	9
1. Současný stav - teoretická část	11
1.1 Screeningové metody	11
1.2 Vyšetřované vrozené vývojové vady	12
1.2.1 Chromozomální aberace	12
1.2.1.1 Downův syndrom	13
1.2.1.2 Edwardsův syndrom	14
1.2.1.3 Patauův syndrom	14
1.2.1.4 Aneuploidie v počtu gonosomů	14
1.2.2. Defekty neurální trubice (NTD)	15
1.3. Rizikové faktory vzniku VVV	16
1.4. Biochemický screening v průběhu těhotenství	17
1.4.1. Screening v I. trimestru těhotenství	17
1.4.2. Screening ve II. Trimestru těhotenství	18
1.4.3. Biochemické markery	18
1.4.3.1. Choriogonadotropní hormon (hCG)	19
1.4.3.2. Plazmatický protein A (PAPP-A)	20
1.4.3.3. Alfa-1-fetoprotein (AFP)	21
1.4.3.4. Nekonjogovaný estriol	21
1.4.3.5. Inhibin A	22
1.4.4. Stanovení biochemických markerů	22
1.5 Ultrazvukové parametry těhotenského screeningu	23
1.6 Software Alpha	25
1.7 Invazivní metody prenatální diagnostiky	26
1.7.1 Amniocentéza	27
1.7.2 Biopsie choria (CVS – Chorionic Vallus Sampling)	27
1.7.3 Kordocentéza	28
1.8 Laboratorní vyšetření fetálních buněk	28
2. Cíle práce	31

3. Metodika	32
3.1 Preamalytická část	32
3.2 Analytický proces	33
3.2.1 Používané reagenční soupravy, jejich příprava a skladování	34
3.2.2 Kalibrace metod	35
3.2.3 Měření kontrol	36
3.2.4 Vlastní měření patientských vzorků	36
3.2.5. Validace a verifikace	37
3.3. Vyhodnocování rizika VVV v programu Alpha verze 7	39
4. Výsledky	41
5. Diskuse	51
6. Závěr	54
7. Seznam použité literatury	55
8. Klíčová slova	60
9. Přílohy	61

Seznam použitých zkratk

AFP	alfa -1- fetoprotein
CRL	temeno-kostrční délka
DNA	kyselina deoxyribonukleová
FISH	fluorescence in situ
GDM	gestační diabetes mellitus
hCG	lidský choriový gonadotropin
HG	hyperemesis gravidarum
IGF	inzulinu podobný růstový faktor
LIS	laboratorní informační systém
MoM	multiples of median (násobky mediánu)
NB	kost nosní
NT	nuchální translucence
NTD	defekt neurální trubice
OKB	oddělení klinické biochemie
PAPP-A	plazmatický protein A
PCR	polymerázová řetězová reakce
QF PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
SOP	standartní operační postupy
uE3	nekonjugovaný estriol
UZ	ultrazvuk
VVV	vrozené vývojové vady

Úvod

Prenatální screening vrozených vývojových vad (VVV) se dnes provádí u všech těhotných žen. Jedná se o kombinaci několika vyšetření, jejichž cílem je odhalení těhotenství se zvýšeným rizikem výskytu závažných VVV. Zahrnuje stanovení biochemických markerů v séru těhotných, jejichž hladina je přítomností vrozené vady ovlivněna. Jedná se především o hormony produkované placentou nebo samotným plodem. Jejich volba se liší pro vyšetření v I. a II. trimestru. Biochemický screening se kombinuje s ultrazvukovými parametry a ve speciálním počítačovém programu určí riziko VVV.

Na téma screeningu vrozených vývojových vad v těhotenství jsem se zaměřila proto, že ho považuji za velmi aktuální. V současné době dochází k nárůstu výskytu vrozených vývojových vad zejména, zejména kvůli odkládání mateřství do pozdějšího věku. Právě vyšší věk těhotné je ale pro vznik vývojových vad jedním s nejvýraznějších rizikových faktorů. Narození dítěte s některou vrozenou vývojovou vadou je pro většinu žen větší tragédií než umělé ukončení těhotenství v případě postižení plodu. (8). Proto je zde prostor pro prenatální screening a diagnostiku.

Navíc v posledních letech se mnoho výzkumů zaměřuje na hledání co nejspolehlivější kombinace markerů, jejich prověřování. Tím bylo dosaženo celkového pokroku v provádění screeningu. Především se stále víc prosazuje screening v prvním trimestru.

V teoretické části své práce se budu zabývat vrozenými vývojovými vadami, jejichž prevence je podstatou screeningových vyšetření těhotných, popisem biochemických markerů a jejich stanovováním, dotknu se využívaných parametrů ultrazvukového screeningu, který neprovádí laboratoř, ale který je nedílnou součástí screeningových testů, a uvedu některé metody další prenatální diagnostiky. V dalších částech popisují metodiku stanovování biochemických markerů na analyzátoru Elecsys® 2010, uvádím jednotlivé části analytického procesu, včetně preanalytické fáze a verifikaci metod. Dále popisují postup při celkovém vyhodnocování výsledků. Následují výsledky screeningů. Měření biochemických markerů ze séra jsem prováděla v laboratoři OKB Městské nemocnice Privamed v Plzni, kde jsem naměřila 60 vzorků pro screening v prvním trimestru a 60 vzorků pro screening ve druhém trimestru. Obě screeningová vyšetření

pro jednu pacientku se zde příliš neprovádějí, velká většina integrovaných testů (tedy testů kombinujících vyšetření v I. i II. trimestru) se dělá na objednávku jiných pracovišť. Vyhodnocení rizika vrozených vývojových vad jsem prováděla v laboratoři Genetiky Plzeň s.r.o., kam jsou výsledky z nemocnice Privamed a. s. zasílány.

1. Současný stav

1.1 Screeningové metody

Screeningové metody slouží k vyhledávání jedinců, kteří disponují zvýšeným rizikem hledaného onemocnění oproti normální populaci. Na rozdíl metod diagnostických pozitivní výsledek screeningu neznamena přímo přítomnost choroby, ale pouze zvýšenou pravděpodobnost jejího výskytu. Řadí tedy jedince do určité rizikové skupiny. Teprve na základě screeningu se pacientovi poskytuje cílená diagnostika. Screening se využívá pro vyhledávání chorob v latentním stádiu, tedy v době, kdy osoba nemá žádné potíže ani klinické příznaky. Aby byl screening efektivní a příliš nezatěžoval pacienta, musí splňovat několik základních podmínek: hledané onemocnění má vysokou prevalenci v populaci nebo populační skupině, test je dostatečně specifický i sensitivní, je neinvazivní a pro pacienta zcela bezpečný a umožňuje včasné odhalení nemoci, na kterou existuje efektivní léčba. Důležitá je i finanční dostupnost testu. (14, 37)

Screening v těhotenství je kombinací vyšetřování biochemických markerů ze séra těhotné a ukazatelů ultrazvuku. Provádí se u všech těhotných žen. Umožňuje záchyt těhotenství se zvýšeným rizikem výskytu závažných vrozených vývojových vad (VVV), Ženám s pozitivním screeningovým testem je poskytnuto genetické poradenství a zpravidla nabídnuta některá z dalších metod prenatální diagnostiky. Ty se neprovádějí u všech žen zejména kvůli jejich invazivitě a ekonomické náročnosti. (8,12)

VVV vedou k závažnému poškození plodu jak po fyzické i mentální stránce. Některé jsou dlouhodobě neslučitelné se životem. Narození dítěte s vrozenou vývojovou vadou je traumatizující událostí pro celou jeho rodinu. Tyto osoby vyžadují celoživotní péči a speciální edukaci. Jde tedy i o problém ekonomický. Těhotenský screening se začal prosazovat v polovině 80. let. Tehdy byla zjištěna souvislost mezi výskytem Downova syndromu u plodu a nízkými hladinami alfa-fetoproteinu v séru matky, zvýšenými hladinami lidského choriového gonadotropinu (hCG) a nízkými hladinami nekonjugovaného estriolu (uE3). Následně bylo zjištěno, že postupem kombinujícím věk matky s naměřenými biochemickými hodnotami lze zachytit až 60% všech plodů

s Downovým syndromem. Postupně se vedle Downova syndromu začala vyšetřovat také trizomie 18 a defekty neurální trubice. První rutinní screeniny se dělaly pouze ve II. trimestru těhotenství tedy od 15. do 18. týdne. Screening v I. trimestru se objevil v 90. letech, kdy byla snaha přesunout screeningové testy do časnější fáze těhotenství. Díky včasnosti screeningu a tím i odhalení případných vrozených vývojových vad se však velmi rychle prosadil. (18, 32)

1.2 Vyšetřované vrozené vývojové vady

1.2.1. Chromozomální aberace

Pohlavní buňky na rozdíl od ostatních lidských buněk obsahují 1 sadu chromozomů (tzv. haploidní), tedy 23. Dělí se během meiózy, zvláštního dělení, kdy vzniká haploidní počet chromozomů. Ostatní buňky obsahují sady 2 celkem tedy 46 chromozomů (Tzv. diploidní). Chromozomy obsahují genetickou informaci uloženou v molekule DNA. Během oplození dojde ke splynutí pohlavních buněk. Pohlavní buňky (oocyt a spermie), tedy mající po jedné sadě chromozomů, tedy splynou v jednu, která už má 2 sady chromozomů. Tato buňka se nazývá zygota. Ta tedy obsahuje 50% genetické informace od otce a 50 % od matky. U každého pohlaví buňky se je 22 chromozomů somatických (autozomů) a jeden chromozom pohlavní. Rozlišují se dva typy pohlavních chromozomů, větší X a menší Y. Vajíčko nese vždy chromozom X. Polovina spermií nese chromozom X, určující ženské pohlaví a polovina chromozom Y určující pohlaví mužské. (12,15)

Jako chromozomální aberace označujeme mutace genomu člověka na chromozomální úrovni. Tyto mutace mohou být numerické nebo strukturní. Mezi strukturní aberace patří například translokace vzniklé výměnou genetického materiálu mezi chromozomy, delece, kdy část chromozomu zcela chybí, duplikace, která se vyznačuje zdvojením úseku chromozomu apod. Nejzrůslehlejší numerické mutace jsou genomové tzv. euploidie, kdy je znásobena celá sada chromozomů (triploidie, tetraploidie). U člověka nejsou slčitelné se životem. (15,47)

Aneuploidie znamená změnu počtu pouze u některého chromozomu (monozomie, trizomie). Vzniká v průběhu dělení buněk při chybné segregaci chromozomů. Mohou se týkat autozomů (somatických genů) nebo gonozomů (pohlavních genů) U člověka se mohou vyskytovat tři dobře popsané aberace autozomů slučitelné se životem: trizomie 21 (Downův syndrom), trizomie 18 (Edwardsův syndrom) a trizomie 13 (Patauův syndrom). Všechny tři uvedené trizomie se projevují mentální a růstovou retardací jedince a mnohačetnými vadami ve vývoji jedince. Jiné změny v počtu autozomů byly zjištěny u spontánně potracených plodů nebo obsahovala jen velmi malé chromozomální segmenty. (33)

1.2.1.1 Downův syndrom

Downův syndrom byl poprvé popsán v roce 1866 Langdonem Downem, chromozomální příčina nemoci však byla objasněna až v roce 1959. Jde o nejčastější chromozomální vadu, zahrnuje zhruba polovinu všech vrozených chromozomálních abnormalit. Vyznačuje se trizomií 21, ta vzniká důsledkem nondisjunkce páru 21. chromozomu, ke které dochází během meiózy (v 90% případy u matky a 10% u otce). Nondisjunkce chromozomů může vzniknout při prvním meiotickém dělení, v tom případě nevzniká žádná gameta s normální sestavou, nebo při druhém meiotickém dělení, pak vzniká gameta se dvěma sesterskými chromatidami, gameta, u které chybí chromozom 21, a dvě gamety s normální sestavou chromozomů. (46)

Pro osoby s Downovým syndromem je charakteristická svalová hypotonie. Obličej je široký a plochý. Typické jsou epikanty – kožní řasy, které se přemostňují přes koutek oka. Ruce jsou krátké, široké, s typickou rýhou na dlani. Celkově jsou postižení menší postavy (kolem 150cm). Downův syndrom je provázen mentální retardací a celkově pomalejším vývojem. Většina postižených, zejména mužů, je neplodná. Lidé s Downovým syndromem mají oproti zdravým lidem vyšší výskyt srdečních vad a poruch imunity. Riziko leukémie je až 15krát vyšší než ve zdravé populaci. V pozdějším věku se častěji rozvíjí Alzheimerova choroba. (33,46)

1.2.1.2. *Edwardsův syndrom*

Jako Edwardsův Syndrom je označována trizomie 18. chromozomu. Výskyt je přibližně 1:5000 narozených dětí. Riziko stoupá s věkem matky. Projevem Edwardsova syndromu je těžká mentální retardace, celkové neprospívání a často těžké vady srdce a ledvin. Nápadně je vystouplé záhlaví a uši nasedající nízko. Držení prstů je charakteristické – postižení drží sevřené pěsti, přičemž kříží druhý prst přes třetí a pátý přes čtvrtý. Většina postižených je spontánně potracena, živě narozené děti se zpravidla nedožijí jednoho roku. (15,46)

1.2.1.3. *Patauův syndrom*

Patauův syndrom se vyznačuje trizomií 13. chromozomu. Vyskytuje se u 1:10000 novorozenců. Projevuje se těžkou mentální i růstovou retardací. Postižení mají vystouplé čelo, častá je mokoencefalie a otevřená švy. Časté jsou rozštěpy patra a rtu. Překřížení prstů bývá stejné jako u trizomie 18. Uši jsou malforované a nízko posazené, u většiny postižených se vyskytuje malforace očí, které mohou splynout v jedno nebo úplně chybět. Z uvedených trizomií má Patauův syndrom nejhorší prognózu, Většina postižených se nedožije měsíce po porodu. (15,46)

1.2.1.4. *Aneuploidie v počtu gonosomů*

Poruchy v počtu gonosomů jsou ve srovnání s autozomálními numerickými anomáliemi relativně méně závažné. Jejich hlavními projevy jsou anomálie genitálií související s poruchami reprodukce a mentální retardace různého stupně. Příkladem je monozomie X nazývaná Turnerův syndrom. Ta se vyskytuje přibližně u 1 ze 4000 dívek. Tento karyotyp může vzniknout oplozením vajíčka spermií bez pohlavního chromozomu nebo ztrátou chromozomu při buněčném dělení. Pro tuto poruchu je charakteristická porucha intelektu a snížená plodnost. Další poruchou je Klinefelterův syndrom, který je vázaný na mužské pohlaví. Postižení mají 47 chromozomů s přebývajícím chromozomem X (47XXY). Předpokládá se, že tento karyotyp vzniká

oplozením vajíčka se dvěma chromozomy X spermií Y. Vzácně se objevují i karyotypy s gonosomy XXYY, XXXY, XXXYY, XXXXY. Pacienti jsou vyššího vzrůstu a jsou u nich zřetelné některé ženské sekundární pohlavní znaky. Mezi méně časté poruchy v počtu gonosomů patří trizomie X (47,XXX) – ta mívá normální fenotyp, někdy se může projevit mírnou mentální retardací nebo poruchou plodnosti. Poslední poruchou, o které se zmíním je syndrom XYY, jehož nositelé bývají fenotypově normální. Terapií gonosomálních poruch je především substituční hormonální léčba. (34,46,47)

1.2.2. Defekty neurální trubice (NTD)

Při zdravém vývoji se nervová trubice uzavírá mezi 2. a 3. týdnem nitroděložního vývoje. Střední mozek se vytváří spojením kraniálního a kaudálního konce (neuroporu) nervové ploténky. V případě NTD se neurospory správně neuzavřou. Defekty neurální trubice jsou závažné vrozené vady, které postihují 1 až 2 z živě narozených dětí. Vznikají v důsledku selhání fúze neurální trubice v časně fázi embryonálního vývoje. (16). Příčinou jsou genetické a environmentální faktory, především porucha v genech podílejících se na vstřebávání kyseliny listové nebo její nedostatečný příjem, dále pak obezita těhotné, gestační diabetes, hypertermie a hispánské etnikum.(1,21)

Mezi nejčastější poruchy NTD patří anencefalie, která vzniká poruchou uzávěru kraniálního neuroporu. U postižených zcela chybí mozkové hemisféry a lební klenba. Méně častou malforací je exencefalie, tedy úplné nebo částečné chybění lebeční klenby, a excefalokéla, tedy defekt krania s výhřezem mozku a blan.(1,7)

Spina Bifida je vada páteře, která může nastat ve kterémkoli místě podél páteře, nejčastěji ale postihuje lumbosakrální oblast. Až v 90% případů vzniká hydrocefalus (zvýšené množství mozkomíšního moku v CNS). Rozeznáváme spina bifida aberta (otevřená, asi 85%) a spina bifida occulta (krytá, asi 15%). Krytou formu nelze prenatalně diagnostikovat UZ, často je asymptomatická, odhaduje se, že jí trpí kolem 2-3% populace. Pokud vznikne vakovitá vychlípenina podél páteře, rozeznáváme podle jejího obsahu meningokélu (výhřez plen CNS s cerebrosinálním mokem) a meningomyelokélu (navíc obsahuje nervovou tkáň). (7,20)

1.3. Rizikové faktory vzniku VVV

Na vznik vrozených vývojových vad mají vliv některé rizikové faktory, především věk těhotné, kouření, chromozomální vady v rodině, gestační diabetes a hypermensis gravidarum.

Mezi roky 1990 a 2005 vzrostl počet těhotných žen ve věku 35-44 let z 68,3 na 94,3 z 1000 těhotných (13). V tomto věku je značně zvýšené riziko především chromozomálních vad způsobených nondisjunkcí chromozomu. To je způsobeno vlivem stárnutí na meiotické chromozomy. Meiotické dělení začíná u žen už v prenatalním vývoji a končí při oplození vajíčka. Před oplodnění zůstávají oocyty ve stadiu profáze prvního meiotického dělení, kdy může dojít k chybnému párování, které vede k nondisjunkci chromozomů. S rostoucí dobou v profázi roste i riziko poruchy párování chromozomů. U mladších žen je tedy riziko aneuploidií podstatně nižší než u žen starších. Za rizikové je v tomto směru považováno těhotenství ve věku nad 35 let matky někdy se uvažuje i věk otce, za rizikový se považuje zpravidla nad 50 let.(46) Tabulka s Rizikem Downova syndromu i trizomií 18. a 13. chromozomu vyplývající z věku matky je součástí této práce. (viz tabulka 6, kap. 9. Přílohy) Ohled je brán také na gestační stáří, neboť mnoho plodů je v průběhu těhotenství potraceno spontánně. (

Dopad kouření na vznik trizomií byl potvrzen výzkumem provedeným v letech 2006-2008. Kuřačky měly prokazatelné nižší hodnoty PAPP-A, HCG a naopak vyšší hodnoty AFP. Při zvážení věku mezi skupinami kuřaček a nekuřaček bylo zjištěno, že kouření vede ke zvýšení rizika pozitivního nálezu zejména u trizomie 18. (53).

Gestační diabetes mellitus (GDM) se definuje jako intolerance glukózy vznikající během těhotenství. Zvýšená hladina glukózy během těhotenství je spojena s rizikem pro plod. Ženy GDM mají zejména zvýšený plazmatický protein A (PAPP-A), což je spojeno s rizikem aneuploidií a rozštěpových vad. Vyšší je také pravděpodobnost spontánního potratu, nízké porodní váhy, růstovou retardací a předčasným odtokem plodové vody (6)

Asi 0,5-2% těhotenství jsou komplikována hypermensis gravidarum (HG), který je charakterizován trvalou nevolností, zvracením, dehydratací, metabolickými poruchami, nedostatkem živin a hubnutím. Tento syndrom je spojen s hyperdekreací HCG a hyperstimulací štítné žlázy. Dochází k uvolňování inzulínu podobného růstového

faktoru (IGF), který ovlivňuje růst plodu a způsobuje další komplikace v těhotenství. U žen s HG měla vyšší hladina PAPP-A pozitivní vliv na rozvoj plodu, pravděpodobně proto, že PAPP-A potlačuje dopad IGF (17)

1.4 Biochemický screening v průběhu těhotenství

Biochemický screening je zaměřen na vyšetřování prověřených biochemických markerů ze séra těhotných žen. Ty se vyšetřují velmi citlivými imunochemickými metodami. Jiné markery se využívají pro screening v I. trimestru, jiné pro screening ve II trimestru.

1.4.1. Screening v I. trimestru těhotenství

Od 9. do 14. týdne těhotenství se v mateřském séru biochemicky vyšetřuje se především plazmatický protein A známý pod zkratkou PAPP-A, ten byl objeven v roce 1991, volná podjednotka HCG (choriogonadotropní hormon), která se začala vyšetřovat o rok později. Tyto markery se v konečném vyhodnocení kombinují s ultrazvukovým vyšetřením nuchální translucence (NT). Screening v tomto stadiu těhotenství je zaměřen především na zjištění rizika chromozomálních aberací, především trizomie chromozomu 21 (Downův syndrom), chromozomu 18 (Edwardsův syndrom) a chromozomu 13 (Patauův syndrom). Dále se určuje riziko závažných morfologických vad plodu a hrozícího potratu. (51)

Prvotrimestrový screening, přestože se začal prosazovat mnohem později než screening ve druhém trimestru, je stále populárnější, díky vynikající detekci, která byla v posledních letech prověřována mnoha výzkumnými týmy po celém světě, a především díky včasné diagnostice. Pro těhotnou je tedy možný pozitivní výsledek méně traumatizující a případné ukončení těhotenství bezpečnější (10)

1.4.2 Screening ve II. trimestru těhotenství

Na rozdíl od prvotrimestrového screeningu je screening ve druhém trimestru těhotenství již dlouhou dobu zavedenou metodou, v zahraničí se zavedl již od konce 80. let. Provádí se v 15. -17. týdnu těhotenství, v některých případech až do 21. týdne. Z biochemických markerů se vždy vyšetřuje alfa-1-fetoprotein a celkové HCG – tzv. double test. Často se vyšetřuje i konjugovaný estriol, který s příchozími parametry tvoří klasický triple test. Někdy se vyšetřuje navíc inhibin A. (20,37)

Screening ve II. trimestru se zaměřuje především na zjištění rizika chromozomálních aberací plodů, zejména na Downův syndrom (trizomie 21), dále zjišťuje riziko defektů kožního krytu, hlavně defekty neurální trubice a riziko preeklampsie. (20)

Pokud byl u pacientky dříve proveden screening v I. trimestru je možné výsledky kombinovat v tzv. integrovaném testu. Z naměřených hodnot se využívá PAPP-A a NT, vyšetření doplňuje hodnotami AFP a total HCG. Tento test má nejvyšší možnou sensitivitu a minimální falešnou negativitu. Vyžaduje však dva odběry v odstupu několika týdnů. (29)

1.1.4.3. Biochemické markery

Vhodný marker pro těhotenský screening je takový, který vykazuje co největší rozdíl hodnot mezi zdravým těhotenstvím a těhotenstvím zatíženým VVV. U těchto markerů nelze stanovit přesné referenční meze, neboť v průběhu těhotenství se jejich hladina výrazně mění. Je tedy nutné výsledek vyhodnotit podle gestačního stáří a korigovat podle dalších kritérií individuálních pro každé těhotenství. Výsledky jsou proto pomocí počítačového programu, přepočítány na násobky mediánu (MoM). Medián je nejčastější hodnota pro dané gestační stáří vycházející ze statistiky. (14, 37)

1.4.3.1. Choriogonadotropní hormon (hCG)

Choriogonadotropní hormon je glykoprotein, který je produkován placentou během těhotenství, jeho celková molekulová hmotnost je přibližně 37000 daltonů. Kromě průkazu těhotenství a sledování jeho průběhu je využíván jako tumorový marker. HCG se skládá ze dvou podjednotek -alfa a beta. Alfa jednotka je kódována jedním genem a má molekulovou hmotnost 14700 daltonů. Beta podjednotka, která je kódována 6 geny obsahuje 145 AK s její molekulová hmotnost je 22200 daltonů. Částečným rozevřením řetězce beta-podjednotky vzniká „nicked hCG“ o stejné molekulové hmotnosti jakou intaktní hCG. Konečným produktem degradace je beta core hCG o molekulové hmotnosti 9300 daltonů. (18,20)

Na rychlém vzestupu hCG již od počátku těhotenství závisí tvorba progesteronu v *corpus luteum*. V moči jej můžeme, díky velmi citlivým testům, prokázat již v prvních dnech těhotenství. Nejnovější testy, které využívají průkaz pomocí monoklonálních protilátek proti hCG i jeho beta podjednotce s tvorbou komplexu protilátka – enzym umožňují určit těhotenství již v době implantace vajíčka. (20)

V průběhu těhotenství se postupně zvyšuje hodnota alfa-podjednotky a to v plazmě i v moči zatímco hodnota beta- podjednotky stoupá do 9. -10. týdne těhotenství, následně klesá až do 22. týdne, opět se mírně zvyšuje do 32. týdne a pak znovu mírně klesá. Free β -HCG (tedy volná beta podjednotka) je osvědčený marker pro stanovení aneuploidií plodu. Mnoho studií potvrdilo, že free beta-hCG v kombinaci s plazmatickým proteinem A (PAPP-A) a sonografickým stanovením nuchální translucence (NT) je vhodný marker pro identifikaci těhotných žen, jejichž plod má zvýšené riziko Downova syndromu v průběhu prvního trimestru (11. -14. týden) těhotenství. Stanovení pouze biochemických markerů zachytí kolem 70%v kombinaci s NT až 90% takto rizikových těhotenství s falešnou pozitivitou kolem 5%. U gravidit s trizomií je free β - hCG na 2,41MoM. (20,25,26)

Free β -HCG je zároveň nejcitlivějším testovaným markerem pro záchyt Turnerova syndromu, kdy se hladina zvýší až na 50MoM. Naopak znatelné snížení je charakteristické pro Edwardsův syndrom. Nevýhodou free β -hCG je možnost vykazování falešně vysokých hodnot při nevhodném transportu, zejména při vyšších teplotách v letním období. (20)

Určení hladiny total HCG (tedy celkové hladiny HCG) se využívá pro určení rizika Downova syndromu v kombinaci s alfafetoproteinem (AFP) a dalšími parametry (délka těhotenství, hmotnost matky,...) v druhém trimestru těhotenství (nejčastěji kolem 15.-17. týdne). (20,37)

1.4.3.2. Plazmatický protein A (PAPP-A)

PAPP-A (z angličtiny Pregnancy associated protein A) je glykoprotein o molekulové hmotnosti 750000 daltonů, je produkován trofoblastem a sekretován do mateřského séra. Tvoří dimerický tetramer složený ze dvou molekul PAPP-A spojený disulfidickými vazbami. Je tedy tvořen čtyřmi polypeptidovými řetězci, které jsou spojeny dusulfidickými můstky po dvou dimerech vázaných nekovalentní vazbou. Každý z dimerů se tvoří podjednotkou PAPP-A a podjednotkou glykosylované formy bazického proteinu. PAPP-A byl prokázán i v séru netěhotných žen v závislosti na menstruačním cyklu s koncentrací cca 80mg/l. Hladina PAPP-A se v séru těhotných zvyšuje již od 6. týdne těhotenství (cca 1,7705g/l) až do 38 týdne (cca 240g/l). V pupečnickové krvi jsou hodnoty o něco nižší. Nejvyšší diagnostickou spolehlivost má v 11. -14.týdnu těhotenství, po 15. týdnu ztrácí diagnostický význam. (18,28)

PAPP-A během těhotenství podporuje růst a vývoj plodu. Výrazné snížení PAPP-A oproti mediánu (0,27-0,31MoM) dosahuje účinnosti až 71% při prevenci Downova syndromu. Dále může snížení předznamenat postižení embrya trizomií 13. a 18. chromozomu, chromozomu X a triploidií nebo hrozící potracení či smrt plodu. (20,32)

Hodnoty PAPP-A jsou nižší u těhotných diabetiček, proto je do budoucna navrhován jako možný marker pro screening gestačního diabetu. Dále se uvádí, že snížené hodnoty můžeme pozorovat u chromozomálně normálních těhotenství počatých *in vitro* nebo intracytoplazmatickou injekcí spermie (ISCI – intacytoplazmic sperm injection). (6,28)

1.4.3.3. Alfa-1-fetoprotein (AFP)

Alfa-1- fetoprotein je fetální glykoprotein o molekulové hmotnosti 70000 daltonů s elektroforetickou pohyblivostí v oblasti alfa-1-globulinů nebo prealbuminů, který je lokalizován na dlouhém raménku 4. chromozomu. AFP je produkován játry plodu a dostává se do jeho krevního oběhu. Ledvinami plodu je pak vylučován do plodové vody a odtud se přes placentu a amniové obaly dostává do krevního oběhu matky. Jeho syntéza je prokazatelná již od 29. dne těhotenství, hladina se zvyšuje do 15. týdne a potom rychle klesá až do 32. -34. týdne s prudkým poklesem hodnot po porodu. AFP se stanovuje také v plodové vodě získané amniocentézou. V tomto případě vykazuje hodnoty 10 krát vyšší než v mateřském séru. V 15. týdnu těhotenství dosahuje hodnota koncentrace AFP v plodové vodě 50 – 100mg/l potom rychle klesá na 5-10mg/l v 24. týdnu. Zvýšená koncentrace AFP v plodové vodě může znamenat kromě otevřené spina bifida a anencefalií také odumření plodu, kontaminaci krví plodu, ale také špatně určený gestační věk plodu (ve 12. -14 týdnu je koncentrace AFP vyšší než v 16. týdnu). Fyziologicky je koncentrace AFP zvýšená u dvojčat. (18,20)

AFP je také výrazným onkologickým markerem, jeho zvýšenou hladinu lze pozorovat u nemocných s nádory vaječníků nebo varlat. Rovněž může signalizovat jaterní cirhózu. (37)

1.4.3.4. Nekonjugovaný estriol (uE_3)

E_3 patří mezi estrogeny. Je to steroidní hormon tvořený vaječníky z androstendionu, který se periferní aromatizací enzymem aromatázou mění na estron (E_1) nebo 17beta-estradiol (E_2). E_1 se pomocí 16-alfa- hydroxylázy hydrolyzuje na estriol E_3 . Volný estriol (uE_3) má molekulovou hmotnost 286 daltonů, jeho prekurzorem je cholesterol, který se na volný estriol mění ve fetálních játrech, následně se přes placentu dostává do mateřského séra. V mateřském séru koncentrace volného estriolu postupně vzrůstá až do konce těhotenství. (18)

Větší část estriolu je konjugována v játrech matky. Pro laboratorní diagnostiku má význam tzv. nekonjugovaná frakce, která tvoří zhruba 10%. Ta se z 60-70% váže na

globulin, který váže pohlavní hormony (sex hormon binding). Dříve se uE₃ stanovoval ve vzorku moče sbírané za 24hodin, dnes se používají imunochemické metody, především RIA a fluorimetrie. Snížená hladina nekonjugovaného estriolu se vyskytuje v mateřském séru u těhotných s Downovým syndromem, rovněž je spolehlivým ukazatelem trizomie 18. (18,20)

1.4.3.5. Inhibin A

Jde o růstový hormon produkovaný v Sertoliho buňkách varlat, v buňkách ovarií a v době těhotenství také placentou. Jde o heterodimer složený z jedné alfa podjednotky o molekulové hmotnosti 18000 daltonů a dvou beta podjednotek o molekulové hmotnosti 14000daltonů. Je markerem pro screening ve II. trimestru, který se uplatňuje jen na některých pracovištích, jinde ho nepovažují za příliš efektivní. Spolu s AFP T-hCG a estriolem tvoří tzv. quadruple test. Dimerický inhibin A se osvědčil lépe než imunoreaktivní. U těhotenství s trizomií 21 je jeho hodnota zvýšena cca na 1,7 MoM. Doporučuje se jako doplňující marker ke klasickému triple testu kvůli zlepšení celkové efektivity screeningu.(11, 20).

1.4.4. Stanovení biochemických markerů

Jednotlivé biochemické markery se vyšetřují v krevním séru těhotné pomocí speciálního imunodiagnostického analyzátoru. Laboratoř OKB v plzeňské Městské nemocnici Privamed používají analyzátor Roche Elecsys® 2010. Tento analyzátor pracuje na základě elektrochemiluminiscenční reakce, tzv. Sendvičovým principem, jde tedy o průkaz založený na reakci antigenu a protilátky. Ačkoli se volba jednotlivých markerů liší pro screening v I. A II. trimestru těhotenství, vyšetřují se stejným principem. (50)

Electrochemiluminiscence je velmi citlivá detekční technika, dosahující širokého měřicího rozsahu a krátké inkubační doby. Analyzátor Roche Elecsys 2010 má temperovaný kruh s 15 kanály pro reagenční soupravy. Otvírání a zavírání reagenčních souprav před a po pipetování je ovládáno automatickým mechanismem. V přední části analyzátoru je kruh s 30 pozicemi pro vzorky, kam je umožněno průběžné vkládání

nových vzorků a kontrol, všechny jsou snímány čtečkou čárových kódů. Roche Elecsys® využívá způsob přenosu dat pomocí dvourozměrných čárových kódů obsahujících veškeré informace k provedení analýzy. (3,4)

Analýza spočívá na tzv. Sendvičovém principu. V prvním kroku se na antigen specifický pro vyšetřovaný marker (PAPP-A, AFP, hCG, apod.), který má dvě vazebná místa naváže biotynilovaná specifická monoklonální protilátka a druhá protilátka značená rutheniovaným markerem. Tato reakce probíhá během první inkubace, která trvá 9 minut. Na ní navazuje druhá devítiminutová inkubace, během níž se přidá streptavidin. Dochází k interakci mezi biotinem a streptavidinem tzv. Streptavidin – biotinivý můstek. Na něj se připojí paramagnetická mikročástice. Následuje detekční elektrochemiluminiscenční reakce. K měřicí komůrce se přitlačí magnet, který zadrží paramagnetické částice. Přebytek vzorku a činidla se odstraní tripropylaminovým pufrům. Po odsunutí magnetu a po zavedení slabého napětí na elektrody začne luminiscenční reakce. Ruthenium – tris (bipyridyl)ový $^{2+}$ komplex se na anodě oxiduje na tris(bipyridyl)ový $^{3+}$, ten se elektronem tripropylaminu redukuje zpět do původního energetického stavu, mezitím vyzáří foton. Množství vyzářených fotonů se měří fotonásobičem. Po ukončení měření se komůrka propláchne alkalickým čistícím roztokem. Současně se zavede napětí, které díky elektrolýze vody podpoří čistící proces. Rychlost analýzy je asi 20 minut, analyzátor je schopný zpracovat 90 analýz za hodinu. Na analyzátor je napojen externí počítač, do kterého přecházejí výsledky analýz, a tiskárna. (3,32,50) Fotografie přístroje Roche Elecsys 2010 a znázornění principu viz obr. 1 -3 kap. 9 Přílohy

1.5. Ultrazvukové parametry těhotenského screeningu

Ultrazvukový screening provádí lékař-gynekolog nebo genetik. Přesto je třeba ho pro úplnost uvést, neboť při celkovém vyhodnocení výsledku screeningu se kombinují výsledky měření biochemického screeningu právě s údaji ze screeningu ultrazvukového.

Ve screeningu v prvním trimestru těhotenství se zadává hodnota CRL (crown-rump length) tedy délka temeno-kostrční a hodnota nuchální translucence. Někdy se při doplňkových vyšetřeních zadává též přítomnost kosti nosní. (20)

CRL je vzdálenost mezi temenem zárodku a jeho kostrčí. Podle naměřené hodnoty je gynekolog schopen odhadnout stáří plodu. Nejpresněji lze určit v prvním trimestru těhotenství. Správně určená délka těhotenství je stěžejní pro správně provedený těhotenský screening, neboť normální hodnoty screeningových markerů se velmi rychle mění. (27)

Měření NT (nuchální translucence) se provádí zpravidla mezi 11. a 13. gestačním týdnem, kdy je v nuchální oblasti přítomna vrstvička tekutiny sahající od hlavičky k zádům plodu. Množství této tekutiny je značně ovlivněno přítomností některých patologických stavů plodu. Anterio- posteriorní měření této vrstvy v mediasagitálním řezu poskytuje přesný odhad množství přítomné tekutiny, provádí-li se správným způsobem. (Caldá, 2007). 11.-13. týden je pro měření NT optimální. Je to proto, že dříve než v 11. týdnu nelze vyšetřit osifikaci fetální lebky, anatomii srdce, úpon pupečníku, nosní kost a přítomnost a velikost močového měchýře. Naopak později, od 14. týdne již není měření šíjového projasnění efektivní, neboť množství tekutiny v šíjové oblasti se v této době u chromozomálních abnormalit snižuje. Navíc čím dříve k vyšetření dojde, tím bezpečnější je pro ženu případné ukončení těhotenství je-li plod patologický. Ke zvýšení množství tekutiny u různých vrozených vývojových vad plodu, které zahrnují srdeční onemocnění, změnu složení extracelulární matrix, selhávání lymfatické drenáže způsobené vadným vývojem plodu nebo vrozenou infekci. S rostoucí hodnotou NT se zvyšuje výskyt chromozomálních aberací plodu. Měření NT je pro screening chromozomálních aberací prokázanou a spolehlivou metodou. Jeho význam ještě roste v kombinaci s biochemickými markery měřenými v I. trimestru (PAPP-A a free- β hCG) a dalšími ultrasonografickými markery, např. měření nosní kosti (NB), měření průtoku krve v ductus venosus (DV) nebo ventila trikuspidální chlopní (TCV – tricuspidal valve) I v případě, že je plod chromozomálně normální, je třeba brát zvýšenou hodnotu NT vážně, neboť s její rostoucí hodnotou roste riziko úmrtí plodu. Především přesahuje-li hodnota NT 3,5 mm. (1,7,30)

Jako doplňkové vyšetření se někdy provádí vyšetření přítomnosti nosní kosti (NB). Absence nosní kosti v 1. trimestru je často dávana do souvislosti s trizomií 21. chromozomu, může ale signalizovat i jiné chromozomální aberace. Je tedy často prosazována jako další ukazatel prvotrimestrového screeningu. Absence NB může také souviset s původem rodičů (je častější u osob afrického původu), s větší tloušťkou NT

nebo s gestačním věkem před 11. týdnem (v případě chybného určení gestačního stáří). Je-li zjištěna absence nosní kosti v 11. -12. týdnu je vhodné vyšetření po týdnu opakovat. Teprve potom lze výsledek použít k výpočtu rizika Downova syndromu. Tím se minimalizuje riziko falešné positivity. (7,45)

Další UZ vyšetření se provádí mezi 18.-22. týdnem. Jeho cílem je zkontrolovat počet plodu a jejich vitalitu, ta se zjišťuje zpravidla kontrolou pravidelné srdeční činnosti. Stanovují se biometrické rozměry, především biparietální průměr, obvody hlavy a trupu, délka femuru, rozměr mozečku a cisterny magny. Biometrické údaje se zaznamenávají do specializovaného softwaru (např. Astraia), který naměřené hodnoty porovná s očekávanými hodnotami, které odpovídají stáří plodu. Na základě údajů lékař určí termín porodu. V této fázi gravidity je již možné rozpoznat většinu morfologických vad plodu. Dané vyšetření však nemůže být 100% spolehlivé. S poměrně velkou přesností (nad 90%) se dají určit některé těžké vady jako anencefalie, chybějící nebo nevyvinuté končetiny nebo spina bifida. (7,27)

Ve třetím trimestru slouží UZ vyšetření pro vyšetření případných vrozených vývojových vad plodu, které vyžadují specifickou péči po porodu, případně k vyhledání nemocí, které se dají léčit in utero. V tomto období se také posuzuje velikost plodu, množství plodové vody a funkce fetoplacentární jednotky. K vadám, které můžeme zjistit při tomto vyšetření patří VVV uropoetického traktu, brániční kýla, vážná vrozená onemocnění srdce, vady GIT, vady mozku a rozštěpy páteře. (18)

1.6 Software Alpha

V softwaru Alpha se provádí vyhodnocení rizika vrozených vývojových vad na základě zadaných markerů biochemických i ultrazvukových v kombinaci s údaji o těhotné (věk, hmotnost atd.) a gestačního věku. Umožňuje několik typů testů: kombinovaný test pro screening v I. trimestru, test pro druhý trimestr, pro nějž se používá název podle počtu zadávaných biochemických markerů (double test, triple test, quadruple test). Výsledky z I. i II. trimestru umožňuje kombinovat do Integrovaného testu. Lze v něm nastavit i moderní variantu prvotrimestrového screeningu tzv. Kontingenční screeningový test. Ten dělí těhotné podle výsledku testu na tři skupiny: s nízkým rizikem (asi 84% těhotných), se středním rizikem (asi 15%) a s vysokým

rizikem (1%). Těhotným s vysokým rizikem se navrhuje invazivní test, ty s nízkým rizikem již nepodstupují žádný další test. Ženy, kterým vyjde střední riziko, podstoupí doplňkové testy (např. přítomnost kosti nostní, tok v ductu venosus, ...). Na základě těchto testů jsou přeřazeny do skupiny s vysokým nebo nízkým rizikem.(8,36)

Za pozitivní výsledek se považuje výsledek s pravděpodobností výskytu vrozených vývojových vad větší než hodnota cut-off, za tu se v České republice považuje riziko 1:300 a vyšší. Z toho vyplývá, že většina plodů žen s pozitivním výsledkem screeningu bude zdravá (test má velkou falešnou pozitivitu). Na základě pozitivního screeningu lékař zpravidla zvolí některou z metod prenatalní diagnostiky. Pozitivní screening má 5 – 7% žen, ale jen zhruba u 1 z 50 žen se na základě invazivní diagnostických metod prokáže vývojová vada.(8,36)

1.7 Invazivní metody prenatalní diagnostiky

K invazivním metodám se v prenatalní diagnostice přistupuje pouze tehdy, je-li riziko vrozených vývojových vad plodu v konkrétních případech zvýšené. Indikací k těmto metodám je především pozitivní screeningový test, kde bylo zjištěno vyšší riziko patologického vývoje plodu, především chromozomálních vad. Další indikací může být vyšší věk matky, zpravidla nad 35 let, výskyt chromozomálních aberací v rodině, předcházející potrat nebo porod s chromozomální abnormalitou, morfologické odchylky plodu zjištěné ultrazvukem, poruchy metabolismu nebo proběhlá infekce v I. trimestru těhotenství. Současnou snahou je provádět odběr v co nejčasnějším stadiu těhotenství, nejlépe již v I. Trimestru. To souvisí s možností ukončení těhotenství, které je v pozdějších fázích pro ženu rizikovější. Přes značný pokrok v prenatalní diagnostice v posledních letech samotný odběr plodové vody, choriových klků či buněk fetu sebou nese jistá rizika, je proto nutné, aby byla indikace dobře uvážena a aby odběr prováděl zkušený lékař. (7,20)

Mezi nejčastěji prováděné invazivní metody patří amniocentéza (odběr plodové vody), kordocentéza (odběr fetálních krevních buněk či séra) a biopsie choria.

1.7.1. Amniocentéza

Jde o nejčastěji používanou metodu prenatální diagnostiky v II. trimestru těhotenství. Jde o odběr plodové vody z amniální dutiny, která se pak biochemicky analyzuje. Z plodové vody se také kultivují fetální buňky pro vyšetření chromozomů.

Množství plodové vody se během těhotenství zvyšuje, maximálního množství dosahuje v 38. týdnu a pak se do porodu snižuje. V embryonálním stadiu ji tvoří primitivní buňky, které obklopují amniotický váček. Postupně tvoří extracelulární tekutinu kolem amniotického váčku, která prostupuje kůži plodu a obal pupečníku. V osmém týdnu je plodové vody přibližně 10ml. Od 11. do 15. týdne její množství stoupá přibližně o 25ml za 1 týden. V době, kdy se provádí amniocentéza tedy v 15. – 16. týdnu je množství plodové vody kolem 240ml. Odebírá se maximálně 20ml, což je množství pro plod bezpečné a výrazně neovlivní množství amniotické tekutiny v tomto období těhotenství. Odběr se provádí tenkou jehlou o síle 0,9 mm a délce 9 nebo 12 cm. Celý odběr musí být pod ultrazvukovou kontrolou. Provádí se transabdominálně. Vpich musí být rychlý a probíhá ve dvou fázích. V první fázi jehla projde břišní stěnou k děloze, ve druhé pronikne do amniální dutiny. Vlastní odběr se musí provádět pomalu, aby se získalo co nejvíce buněk pro vlastní cytogenetickou analýzu. Dříve se odběr prováděl pod anestézií, postupně se od toho upustilo, neboť díky ostrosti jehly je vpich minimálně bolestivý a samotná anestezie sebou přinášela komplikace. (8,9,20,33)

1.7.2. Biopsie choria (CVS – Chorionic Villus Sampling)

Biopsie choria umožňuje získání vzorku fetálních buněk již v 9. týdnu těhotenství. Někdy se provádí tzv. pozdní biopsie choria po 12. týdnu těhotenství, kdy se odebírá vzorek placenty. Ta se dá provést i v pozdních stádiích těhotenství. Z buněk choria lze kromě zjištění karyotypu vyšetřit i polymorfismus DNA. (45)

Choriové klky jsou derivátem trofoblastu tedy extraembryonální části blastocysty. V průběhu implantace se trofoblast diferencuje na dvě části – cytotrofoblast a syncytiotrofoblast. Syncytiotrofoblast se dostává do stěny dělohy a vytváří „lakuny“,

kterými může protékat mateřská krev. Již na konci 2. týdne se výběžky cytotrofoblastu spojí se syncytiotrofoblastem, čímž se vytvoří primární choriové klky. Výběžky se větví a postupně do nich vrůstá mezenchym a vznikají sekundární klky, které na rozdíl od primárních obsahují jádro. V jádře vznikají kapilární sítě, kterými proudí krevní oběh – tak vznikají klky terciální. Ty na konci osmého týdne zcela pokrývají povrch choriového vaku. Právě terciální klky, tvořené mezenchyálním jádrem, cytotrofoblastem a syncytiotrofoblastem, jsou odebírány pro prenatální diagnostiku. Nejčastěji se odběr choriových klků provádí transabdominálně. Používá se ruční aspirátor, stříkačka a jehla o síle 0,9 mm. Kůže na břicho těhotné musí být důkladně desinfikovaná. Jehla se zavádí do choriové tkáně v podélné ose pod stálou kontrolou ultrazvuku. Získává se 10 – 20mg. Méně často se tkáň odebírá transcervikálně za použití speciálních bioptických kleští, kterými se odštípne část chorivé tkáně. Odběr se samozřejmě opět kontroluje pod UZ. Po provedení biopsie choria je nutné počítat s možným výrazným vzestupem AFP. (9, 45, 33)

1.7.3 Kordocentéza

Jde o přímý odběr fetální krve punkcí pupečnicku (*vena umbilicalis*). Bezpečně lze provést až po 20. týdnu těhotenství, kdy je pupečník na UZ dostatečně viditelný. Z lymfocytů fetální krve lze stanovit karyotyp, ale i imunitní onemocnění. Dále lze z krve plodu určit krevní onemocnění, infekce plodu, stanovení krevních plynů a Rh imkompatibilitu. Vlastní odběr se provádí transabdominálně, samozřejmě je kontrola ultrazvukem. Používá se jehla o průměru 0,7mm. Nejčastěji se punkce provádí v místě úponu pupečnicku na placentu nebo v abdominálním úponu pupečnicku. Odebírají se 1-3 ml fetální krve. (9,20)

1.8. Laboratorní vyšetření fetálních buněk

Standartní metodou zpracování vzorku amniocentézy je stanovení karyotypu kultivovaných buněk fetu. Buňky se kultivují ve standadizované mediu, které podporuje

dělení a růst buněk. Vzorek se nanese a na sklíčko a obarví. Při dělení buněk je po obarvení možno v optickém mikroskopu pozorovat karyotyp. Tato metoda umožňuje odhalení strukturálních i numerických aberací. Její největší nevýhodou je délka zpracování vzorku (až 2 týdny). (15,31,33)

Další metody využívané k odhalení chromozomálních vad jsou FISH (fluorescence in situ) a PCR, které jsou výhodné pro rychlejší stanovení (do 48 hodin) i pro jejich nižší náklady a možnost automatizace. Tyto metody jsou velmi spolehlivé při stanovování nejčastějších trizomií 13,18 a 21. Bohužel ale nedokáží zachytit některé méně časté aberace jako delece a translokace. (8)

Metoda FISH se také používá jako dourčovací metoda po pozitivním nálezu při kultivaci buněk. Metoda FISH spočívá v označení chromosomů fluorescenčními sondami. Na úseky DNA se naváže fluorescenční barvivo, které je komplementární k danému úseku DNA. Sondy se podle zaměření dělí na centromerické (vyšetřují centromeru chromosomu), telomerické (zaměřené na subtelomerickou část) nebo lokus specifické sondy pro určité geny nebo jejich skupiny. Sonda se denaturuje za zvýšené teploty a aplikuje se na chromozomový preparát. Potom se preparát se nechá inkubovat přes noc v termostatu. Nadbytečná sonda se odmyje a navázaná sonda se lokalizuje roztokem obsahujícím tzv. reportéry. Po navázání reportérů se aplikuje roztok jiného fluorescenčního barviva, které vizualizuje chromozomy a jádra. Místo, je navázaný reportér je pak možno lokalizovat ve fluorescenčním mikroskopu. (15,24)

PCR (polymerázová řetězová reakce) umožňuje sledovat krátké sekvence genů, tak že nahrazuje u jednovláknové DNA chybějící vlákno obdobně jako při replikaci DNA. Využívá k tomu Taq- polymerázy. Nejprve se vzorek DNA zahřeje na 94°C, čímž se přeruší vodíkové vazby polynukleotidového řetězce. Poté se teplota sníží na 60°C a krátké nukleotidové řetězce (primery) se nanávážou na DNA. V dalším kroku se při 72°C polymeráza posouvá po vlákně DNA a syntetizuje komplementární vlákno, čímž vytváří molekulu DNA. Tento cyklus se opakuje, při každém cyklu se množství DNA zdvojnásobí.(33)

Moderní v prenatální diagnostice je QF PCR (quantitative fluorescent polymerase chain reaction), která umožňuje potvrdit nebo vyloučit numerické odchylky vybraných chromozomů max. do dvou dnů. Většinou je zaměřena na numerické aberace chromozomů 21,18,13, X a Y. Kity pro tuto metodu mají fluorescenčně značené

primery pro specifické lokusy na sledovaných chromozomech. Jde o úseky obsahující polymorfní sekvence mikrosatelitní DNA, jejichž délka je vysoce variabilní. To je pro diagnostiku výhodné. Provedení PCR je monitorováno v reálném čase, množství namnoženého produktu se sleduje na obrazovce jako píky. Pro trizomii sledovaného chromozomu svědčí tři různé píky, tedy přítomnost tří různých chromozomů, na kterých má variabilní lokus odlišnou délku. Trizomii však může signalizovat i přítomnost dvou píků ve výšce v poměru 2:1. (24,49)

2. Cíle práce

Pro svoji práci jsem zvolila následující cíle:

1. Seznámení se screeningem vrozených vývojových vad, jeho provedením a způsobem vyhodnocení
2. Popis biochemických markerů, které jsou součástí prenatálního screeningu
3. Popis některých metod prenatální diagnostiky

3. Metodika

V laboratoři OKB Městské nemocnice Privamed a. s. v Plzni jsem pracovala se náhodně vybranými vzorky pacientek z denního provozu, které jsou zpravidla svázeny od lékařů – gynekologů z Plzně a okolí. U těchto pacientek jsem měřila hodnotu biochemických markerů pro screening v I., tedy vyšetření PAPP-A a free β hCG, nebo II. trimestru, kde jsem vyšetřovala hodnotu AFP a celkového HCG. Pro biochemickou analýzu jsem používala analyzátor Roche Elecsys® 2010. Celkové vyhodnocení výsledků jsem dělala v programu Alpha ve spolupráci s laboratoří Genetiky Plzeň, které navazuje na vyšetření z nemocnice Privamed, odkud jsou zaslány výsledky biochemie.

3.1 Preanalytická část

Preanalytická část je velmi důležitá, zahrnuje všechny činnosti související s přípravou a poučením pacienta, vlastní odběr a transport materiálu a manipulaci s materiálem v laboratoři před vlastní analýzou, ta zahrnuje příjem vzorku, jeho označení a další přípravu k analýze (např. centrifugaci). Chyby v preanalytické části může negativně ovlivnit celý výsledek vyšetření, je proto nutné věnovat pozornost jejímu správnému průběhu. (14,37)

Důležitým předpokladem pro přesné výsledky je správně provedený odběr krve. Laboratoř OKB Privamed v Plzni má odběrovou místnost, většina materiálu je ale svázena z Plzně a okolí svozovou službou. Standardní odběr se provádí většinou v ranních hodinách nalačno. Osoba, která odběr provádí, poučí pacientku s postupem odběru. Je nutné správně a čitelně uvést identifikační údaje na zkumavkách (jméno, rodné číslo). Před odběrem se desinfikuje kůže v místě vpichu vhodným desinfekčním prostředkem. Bezprostředně před odběrem se musí zkontrolovat kvalita jehel, stříkaček a zkumavek. Odebírá se žilní krev zpravidla z povrchové žíly horních končetin do vakuované zkumavky. Používají se zkumavky se speciálním gelem, který vytvoří bariéru mezi sérem a koagulem. Doporučené odebrané množství krve je 5ml. Po odběru se místo vpichu zakryje náplastí nebo gázou, doporučuje se zakrytí minimálně 15 minut.(35)

Na žádance pro screening vývojových vad musí být uveden: věk matky, hmotnost matky a gestační věk k datu ultrasonografie. Žádanky na screening jsou součástí přílohy (viz obr. 4 a 5, kap. 9 Přílohy) Do biochemické laboratoře přijde žádanka s již vyplněnými ultrazvukovými markery (CRL, NT), ty vyplňuje ošetřující gynekolog. Odebraná krev se ihned transportuje do laboratoře spolu s vyplněnou žádankou. Je třeba, aby transport byl co nejrychlejší, neboť vyšetřované markery jsou při pokojové teplotě stabilní v séru jen několik hodin. Konkrétní údaje o stabilitě jednotlivých analytů v séru jsou zaznamenány v tabulce 1.

Tabulka 1. Stabilita vyšetřovaných analytů v séru

analyt	Stabilita v séru při 20 – 25°C	Stabilita v séru při 4-8°C	Stabilita v séru při -20°C
Freeβ-hCG	6 hodin	1 den	1 rok
Total hCG	12 hodin	3 dny	1 rok
AFP	12 hodin	7 dnů	1 rok
PAPP-A	12hodin	3 dny	1 rok

Při delším transportu jsou vzorky převáženy v termoboxech s tepelnou izolací, aby se minimalizovalo riziko poškození vzorků. Po doručení materiálu do laboratoře je nutné zkontrolovat údaje na žádance i na zkumavce, potom se zkumavce i žádance přidělí čárový kód, pod kterým se materiál vyšetřuje celou dobu v laboratoři a údaje se zadají do laboratorního informačního systému LIS (software pro příjem materiálu do laboratoře). (35)

Protože se k vyšetření používá krevní plazma, je před samotnou analýzou nutná centrifugace. Ta se provádí při 3000 otáčkách /min po dobu 10 minut.

3.2. Analytický proces

Analytický proces zahrnuje všechny děje v průběhu vlastního zpracování materiálu. Probíhá buď automatizovaně, nebo manuálně. Pro správnost výsledku je nutné dodržet všechny zásady laboratorní práce, jak po stránce logistické, která zahrnuje manipulaci a uchování analytického vzorku před vlastní analýzou a skladování a

kontrolu používaných reagensů, tak i po stránce analytické, ta představuje správný pracovní postup a dohled na průběh reakcí, interní kontrolu kvality a její vyhodnocování i důslednou kalibraci a kontrolní analýzy. Dále je třeba udržovat technický stav laboratorních přístrojů a kontrola funkce instrumentální techniky. (14,37). Laboratoř musí mít pro analýzu stanovené standardní operační postupy (SOP), které je nutné přesně dodržovat.

3.2.1. Používané reagenční soupravy, jejich příprava a skladování

Reagenční soupravy pro analyzátor Roche Elecsys® 2010 jsou označeny čárkovým kódem, který obsahuje veškeré informace o identifikaci jednotlivých souprav, jejich šarži i kalibrační data. Reagencie, které jsou součástí jedné soupravy nelze použít odděleně. K vyšetření screeningových markerů jsou dodávány sady pro 100 testů. Sady jsou různé pro každou metodu a obsahují 3 nádobky:

Pro metodu PAPP-A: 1. nádobka obsahuje mikročástice potažené streptavidinem, 2. nádobka monoklonální protilátku proti PAPP-A s biotinem, tedy anti PAPP-A-Ab-biotin a TRIS pufr 50mol/l o pH 7,0. 3. nádobka obsahuje monoklonální protilátku značenou ruthenium- tris(bipyridyl)ovým²⁺komplexem 1,0 mg/l, tedy Anti PAPP-A-Ab- Ru(bpy)₃²⁺ a fosfátový pufr 50 mmol/l o pH 7,4. (42)

Pro ostatní metody jsou sady podobné, liší se obsaženým pufrům, jeho koncentrací a pH a koncentrací rutheniového komplexu; pro úplnost:

Pro metodu free βhCG jsou v 1. nádobce mikročástice potažené streptavidinem, ve 2. monoklonální protilátka anti βhCG-Ab-biotin s fosfátovým pufrům 40 mmol/l o pH 6,8 a ve třetí nádobce Anti βhCG -Ab-Ru(bpy)₃²⁺s rutheniovým komplexem 1,6mg/l a fosfátový pufr o 40 mmol/l, pH 7,0. (40)

Pro metodu AFP jsou v 1. nádobce mikročástice potažené streptavidinem, ve 2. monoklonální protilátka anti AFP-Ab-biotin a fosfátový pufr 100 mmol/l, pH 6,0, a ve 3. nádobce Anti AFP-Ab-Ru(bpy)₃²⁺ s rutheniovým komplexem 12 mg/l a fosfátový pufr o 100mmol/l, pH 6,0. (38)

Pro metodu hCG jsou v 1. nádobce opět mikročástice potažené streptavidinem, ve 2. monoklonální protilátka anti HCG-Ab-biotin a fosfátový pufr o 40 mmol/l, pH 7,5

a ve 3. nádobce Anti hCG -Ab-Ru(bpy)₃²⁺ s rutheiniiovým komplexem 4,6 mg/l a fosfátový pufr o 40 mmol/l, pH 6,5. (41)

Reagencie se v analyzátoru ukládají do tzv. reagenčního krauselu, který je pod poklopem. V něm je celkem 18 pozic, z nichž 15 je určených pro soupravy reagensů a zbývající 3 pro ředící a přípravné roztoky. Přístroj má automatický mechanismus otvírání a zavírání víček reagensů.

Reagencie se uchovávají v chladničce při teplotě 2-8°C, je nutné je skládat ve vzpřímené poloze. Po otevření je jejich trvanlivost při chladničkové teplotě 12 týdnů, je tedy třeba zaznamenat datum otevření. V analyzátoru mohou být maximálně 4 týdny.

Důležitý pro průběh reakce je také systémový roztok ProCell, který se používá pro všechny šarže. Je používán úpravu elektrod, promývání částic potažených streptavidinem a pro vytváření signálu. Je tvořen fosfátovým puffem 300 mmol/l, tripylaminem 180 mmol/l, detergentem a konzervanty, jeho pH je 6,8. ProCell se vkládá do analyzátoru nejméně hodinu před vlastní analýzou. Skladuje se při pokojové teplotě (doporučuje se 15-25°C). Otevřený je stabilní 3 dny v analyzátoru 4 dny.

Nezbytnou reagensů je čistící roztok Clean Cell i ten se používá pro všechny šarže reagensů a slouží k čištění hadiček a měřící cely po každém měření a k úpravě elektrod. Při manipulaci s ním je třeba klást zvláštní důraz na používání ochranných pomůcek, neboť je silně alkalický (pH 13,2), jde o KOH o koncentraci 176mmol/l. Do analyzátoru se vkládá minimálně 1 hodinu před použitím, skladování je stejné jako u ProCell. (4, 39,44)

3.2.2. Kalibrace

Kalibrátory jsou dodávány v nádobkách určených přímo k vložení do pozic se vzorky. Nádobky jsou označeny čárkovými kódy a celá souprava je doplněna kartami s dvourozměrnými čárkovými kódy, ve kterých je uložen i popis kalibrační křivky a identifikace kalibrátoru, ta musí být uložena čárkovým kódem do analyzátoru (3). Kalibrátory se uchovávají chlazené nebo namražené, je proto nutné je před vlastní kalibrací vytemperovat na laboratorní teplotu. V soupravě jsou dva kalibrátory o různých koncentracích, které umožňují dvoubodovou kalibraci pro vytvoření výrobcem předdefinované kalibrační křivky, která je uzpůsobena pro analyzátor Elecsys. Je nutné

dát do stojánku kalibrátor 1 na pozici 1 a kalibrátor 2 na pozici 2. Kalibrace se vždy provádí pro celou soupravu reagensů novými reagensy do 24 hodin od vložení reagensů do analyzátoru. Tato kalibrace je platná pouze pro tuto soupravu. Doporučuje se obnovovat kalibraci nejpozději po 28 dnech při používání stejné šarže reagensů a dále podle potřeby (např. při kontrole kvality). Po vyhodnocení kalibrace se objeví report kalibrace. Pokud byla kalibrace úspěšná je tlačítko testu zelené. Při problematické kalibraci je tlačítko žluté, taková situace je třeba nahlásit VŠ pracovníkovi laboratoře. Po kalibraci následuje měření kontrol, teprve potom můžeme měřit vzorky pacientů.(4)

Pro screeningové markery se používají kalibrátory Elecsys PAPP-A CalSet, Elecsys hCG CalSet, Elecsys AFP CalSet apod., které jsou standardizovány podle standardní přípravy IRP (International Reference Control)

3.2.3. Měření kontrol

Měření kontrolních vzorků se provádí vždy před měřením samotných patientských vzorků, abychom zkontrolovali správnost měření analyzátoru. Jejich měření se provádí zpravidla ráno před započetím rutinního provozu. Kontroly pro všechny měřené markery jsou součástí systému Elecsys. Jsou, stejně jako kalibrátory, dodávány v nádobkách určených přímo pro vložení do pozic pro vzorky a také jsou vybaveny dvourozměrným čárovým kódem, v němž jsou uloženy informace o správném rozmezí kontrol.

3.2.4. Vlastní měření patientských vzorků

Zkumavky s čárovými kódy se umístí do stojánku tak, aby kódy byly umístěny do výřezu ve stojánku do pozice určené pozice. Stojánky jsou umístěny do linie podavače a systém se spustí v počítači s dotykovým displejem, který je součástí analyzátoru Roche Elecsys® 2010. V analyzátoru jsou již připraveny reagensie potřebné k analýze. Stisknutím pozice v analyzátoru můžeme sledovat stav jednotlivých vzorků, včetně zadaných testů a času, který zbývá do konce analýzy. Analyzátor

automaticky vypočítá koncentraci analytu pro každý vzorek v jednotkách mIU/mL nebo UI/L. Po naměření vzorku se výsledek odešle na napojený počítač, zároveň je připojena tiskárna, takže laboratoř všechny výsledky tiskne a uchovává v archivu. Výsledky jsou dále posílány do laboratoře Genetiky Plzeň s.r.o., kde se pomocí softwaru Alpha provádí vyhodnocení rizika vrozených vývojových vad.

3.2.5. *Validace a verifikace*

Validací se rozumí postupy, které vedou k objektivnímu ověření, že daný postup nebo přístroj splňují požadavky pro zamýšlené specifické použití nebo aplikaci. Verifikace potvrzuje dostatečnou úroveň měření, korektnost postupů měření a řádně provedenou kalibraci na základě objektivních dat, která se získávají za použití dat z laboratorních experimentů, z dokumentace dané výrobcem a z vědeckých a odborných publikací. Pro klinické laboratoře validaci provádí zpravidla již výrobce in vitro diagnostik (IVD). Její rozsah a postup je dán normou EN 13612:2002). Validace nebo certifikace se provádějí vždy při zavedení nové metody, měřicího systému nebo zavedení nového diagnostického kitu. Revalidace (reverifikace) se provádí po roce. O proběhlé validaci i verifikaci je nutné vést dokumentaci. Validační plán zahrnuje přesnost, výtěžnost (bias), linearitu, mez detekce, interferenci a porovnání s jinou metodou. (19,37,48)

Verifikace metod byla provedena dne 28. 10. 2011, 18.9-27. 9. 2011 na analyzátoru Elecsys® 2010 byly měřeny vzorky denních kontrol. U každého analytu bylo provedeno 10 měření. Tím se prokázalo, že metoda splňuje specifické požadavky.

Pro ověření, zda je metoda splňuje nároky na přesnost, tedy těsnost shody mezi nezávislými výsledky měření, se ověřuje opakovatelnost a reprodukovatelnost metody. Provádí se série analýz, která následně vyhodnocena statisticky. Pro určení opakovatelnosti (repeability) metody se provede série měření kontrolního vzorku v řadě na stejném zařízení a stejnou obsluhou. U každé metody bylo naměřeno 5 vzorků. Pro

stanovení reprodukovatelnosti (reproducibility) metody bylo provedeno měření vzorku vždy jednou denně po dobu 10 dnů.

Z naměřených hodnot byl vypočítán aritmetický průměr podle vzorce:

$$\bar{x} = \sum x^i / n$$

kde x_i jsou naměřené hodnoty a n je počet hodnot.

Rozptyl (s^2) se vypočítá jako součet druhých mocnin rozdílů naměřených hodnot x_i od průměru:

$$s^2 = \sum (x_i - \bar{x})^2 / n - 1$$

Směrodatná odchylka (SD) je údaj o nejistotě průměru. Vypočítá se jako druhá odmocnina rozptylu.

$$SD = (s^2)^{1/2}$$

Variační koeficient (CV) je poměr směrodatné odchylky a aritmetického průměru, zpravidla se uvádí v procentech:

$$CV (\%) = 100 * s / \bar{x}$$

Systematická odchylka (bias) vyjadřuje rozdíl mezi střední hodnotou zkoušky (x) a certifikovanou hodnotou x_0 . Bias představuje kvantifikaci systematické chyby měření.

$$bias (\%) = 100 * [(x - x_0) / x_0]$$

Nejistotu systematické odchylky dostaneme pomocí standartní nejistoty průměru, kterou vypočítáme podle vzorce :

$$u_{xp} = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Kde n je počet měření

Samotnou nejistotu systematické odchylky pak podle:

$$u_{r, xp} = \frac{u_{xp}}{X_p} \times 100 (\%)$$

Kde X_p je průměrná hodnota

Ke zjištění kombinované nejistoty, je nutné zjištění dílčích nejistot. Jedná se o kombinaci vyčíslených dílčích složek nejistot. K jejímu vyčíslení se používá kalkulátor, který je dostupný na webu www.cskb.cz. K výpočtu se využívá vzorce:

$$u_{r,tot} = \sqrt{(u_{r,repr}^2 + u_{r,ref}^2 + B_r^2 + u_{r,xp}^2)}$$

Kde $u_{r,repr}$ je variační koeficient mezilehlé přesnosti (reprodukovatelnosti)

$u_{r,ref}$ je nejistota hodnota referenčního materiálu

B_r je bias (systematická odchylka)

$u_{r,xp}$ je nejistota systematické odchylky

Stanovení dlouhodobé přesnosti zahrnuje systematickou odchylku laboratoře. Z naměřených hodnot za celý kalendářní rok se vypočte průměr x_p , směrodatná odchylka SD_{repr} a variační koeficient CV_{repr} v procentech. (48)

$$SD_{repr} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_p)^2}{n - 1}$$

$$CV_{repr} = \frac{SD_{repr}}{X_p} \times 100(\%)$$

3.3. Vyhodnocování rizika VVV v programu Alpaha verze 7

Program Alpha je vyráběn londýnskou firmou Logical Medical Systems, distributorem pro Českou republiku je firma AntiVir s.r.o.

V programu jsou vloženy tzv. kredity, které registrují počet operací (výpočtů rizik), tyto kredity jsou dvojího druhu, kredity A, které jsou určeny pro výpočet rizika v prvním nebo druhém trimestru a kredity B určené pro testy kombinující výsledky z prvního a druhého trimestru.

Nejprve se v okně pro vkládání dat zadají osobní data pacientky. Základní tabulka na obrazovce je nastavená pro integrovaný test (tedy pro kombinaci markerů z prvního i druhého trimestru), dají se do ní ale zadat i údaje pouze pro screening ve II. trimestru. V tomto případě se zadává gestační stáří určené ultrazvukem, datum UZ a jméno sonografisty (ten se vybere z databáze), počet plodů, věk matky a její hmotnost. Z biochemických markerů se vloží hodnoty AFP v nanogramech/ml a T-hCG v KIU/L. Nastavení umožňuje i vložení nekonjugovaného estriolu a inhibinu A, ty ale Genetika

Plzeň s.r.o. nezadává. Hodnoty screeningových ukazatelů jsou po korekci na hmotnost matky přepočítány na násobky mediánu (střední hodnoty) pro určitý týden gravidity. Uvádí se pod zkratkou MoM (Multiples of median). Hodnoty MoM jsou stanoveny výrobcem kitu statisticky. Minimální počet vzorků pro stanovení MoM je 100, ale platí, že čím více měření se do statistiky zahrnuje, tím je stanovení MoM přesnější. Program vyhodnocuje riziko Downova syndromu a defektů neurální trubice.

Pro screening v prvním trimestru se používají pro vložení dat pole, kam se kromě údajů o těhotné (jak v předchozím případě) zadává, CRL, UZ přístroj, počet plodů, hodnoty NT, PAPP-A, free- β hCG. Nejprve je nutno nastavit koeficienty pro CRL/gestační stáří, ty se vloží do tabulky a podle zadaného CRL se vypočítá gestační stáří ve tvaru dny + týdny. Opět se z databáze vybere sonografista. Hodnota NT se zadává v mm, biochemické markery PAPP-A a free- β hCG se zadávají v IU/l. program hodnoty opět přepočítá na MoM v závislosti na gestačním stáří, věku těhotné a hmotnosti. V tomto případě program vyhodnotil riziko trizomií 21, 18 a 13.

Jako kontrola kvality se u programu Alpha provádí stanovení kontrolního vzorku podle protokolu. Ten je do laboratoře Genetiky Plzeň s.r.o. zasílán z Centra lékařské genetiky a reprodukční medicíny Gennet v Praze. Poslední kontrola proběhla dne 14. 5. 2012. Do programu se zadávají údaje jako u vyšetřovaného vzorku. Pro každý typ screeningu 2 vzorky – jeden s pozitivním a jeden s negativním výsledkem.

4. Výsledky

V období 15. 11. 2011 – 20. 2. 2012 jsem provedla měření 60 patientských vzorků pro screening v 1. trimestru a 60 patientských vzorků pro screening ve 2. trimestru v biochemické laboratoři Městské nemocnice Privamed a.s. v Plzni. Jde o náhodně vybrané vzorky, každý vzorek je od jiné pacientky. Vyhodnocení výsledků jsem pak prováděla v kombinaci s ultrazvukovými markery. Výsledky všech markerů, klinických dat i vyhodnocení rizika vyšetřovaných aberací. Vyhodnocování proběhlo v laboratoři Genetiky Plzeň s.r.o. pomocí programu Alpha.

U každého vzorku jsem v obou tabulkách uvedla číslo 1-60 podle pořadí v jakém byly měřeny. Dále jsem uvedla gestační stáří v době odběru ve tvaru týdnů + dny a hmotnost pacientky.

V tabulce číslo 2, výsledcích prvotrimestrového screeningu, jsou dále uvedeny hodnoty free- β hCG (volná β podjednotka lidského choriového gonadotropního hormonu) a PAPP-A (plazmatický protein A) a to jak hodnoty naměřené v laboratoři tak i vyjádřené v násobcích mediánu (MoM), v dalších sloupcích jsou uvedeny hodnoty CRL (temenokostrční délka) a NT (nuchální translucence), které jsou získávány ultrazvukem a jejich hodnoty posílá do laboratoře sonogafista. V následujících sloupcích jsou uvedena rizika trizomií 21., 18. a 13. chromozomu ve formě pravděpodobnosti. V posledním sloupci je celkový výsledek screeningu.

U vzorku č. 39 jde o těhotenství s dvojčaty, v tomto případě se riziko vrozených vývojových vad vyhodnocuje u každého plodu zvlášť.

Ve tabulce číslo 3 jsou vedle gestačního stáří a hmotnosti matky uvedeny hodnoty AFP (alfa-1-fetoprotein) a total hCG, jak v hodnotách naměřených v mateřském séru tak v MoM, v dalších sloupcích je výpočet rizika Downova syndromu a defektu neurální trubice (NTD) a celkové vyhodnocení screeningu.

Pod tabulkami jsou uvedeny grafy znázorňující poměr pozitivních a negativních vzorků a počet pacientek podle gestačního stáří plodu.

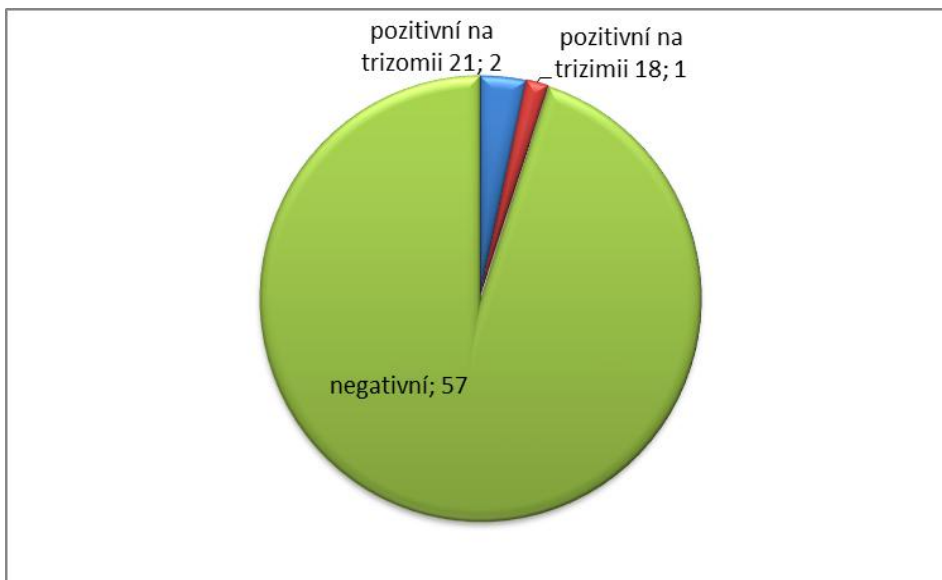
Tabulka č. 2 výsledky prvotrimestrového screeningu

číslo vzorku	věk	hmotnos t [kg]	gestační stáří	free-β hCG [UI/L]	free-β hCG [MoM]	PAPP-A [UI/L]	PAPP-A [MoM]	CRL [mm]	NT [mm]	riziko trizomie2 1	riziko trizomie 18	riziko trizomie 13	výsledek
1	27	90	14t+0	11,3	0,475	3,572	0,872	83	1,8	1:23048	1:272020	1:418299	negativní
2	29	75	13t+3	16,9	0,643	5,928	1,412	74	1,8	1:18895	1:18895	1:524960	negativní
3	31	65	14t+1	25,5	0,870	5,450	0,891	84	2,3	1:7947	1:168984	1:335218	negativní
4	31	80	13t+3	11,7	0,463	2,699	0,715	73	1,4	1:15654	1:171196	1:17956	negativní
5	37	78	11t+6	24,5	0,706	1,663	0,804	52	1,3	1:4075	1:48099	1:108900	negativní
6	26	62	12t+6	86,2	2,618	2,767	0,662	66	1,2	1:1069	1:299983	1:706176	negativní
7	29	85	11t+6	56,1	1,352	2,335	1,352	53	1,5	1:20036	1:236468	1:556659	negativní
8	28	65	13t+5	35,2	1,255	8,179	1,480	78	2,5	1:7808	1:233704	1:349869	negativní
9	32	63	13t+0	13,5	0,428	1,775	0,428	67	2,0	1:12228	1:18159	1:18363	negativní
10	29	81	12t+5	31,0	1,137	2,323	0,822	64	2,1	1:4984	1:222152	1:458818	negativní
11	31	68	12t+4	43,2	1,326	5,624	1,677	62	1,3	1:14612	1:172448	1:405953	negativní
12	26	56	13t+4	31,5	0,984	12,215	2,040	75	2,1	1:25419	1:300002	1:706221	negativní
13	33	70	12t+4	51,8	1,600	2,776	0,882	61	1,8	1:8930	1:119856	1:282147	negativní
14	21	155	11t+6	83,7	3,176	3,445	2,727	52	1,6	1:29832	1:352083	1:828824	negativní
15	33	60	13t+1	27,2	0,838	1,741	0,369	69	2,2	1:726	1:27859	1:8966	negativní
16	32	69	13t+2	14,3	0,507	3,596	0,860	71	1,8	1:12245	1:144521	1:233473	negativní
17	24	58	12t+4	34,7	0,953	3,907	0,977	62	1,8	1:27930	1:329638	1:775988	negativní
18	33	61	13t+1	28,2	0,897	3,941	0,868	69	2,4	1:3069	1:120945	1:160208	negativní
19	30	50	14t+1	19,8	0,566	15,776	1,961	84	2,6	1:7099	1:170614	1:233040	negativní
20	30	85	13t+1	64,1	2,567	2,764	0,858	70	2,0	1:1075	1:204431	1:481243	negativní

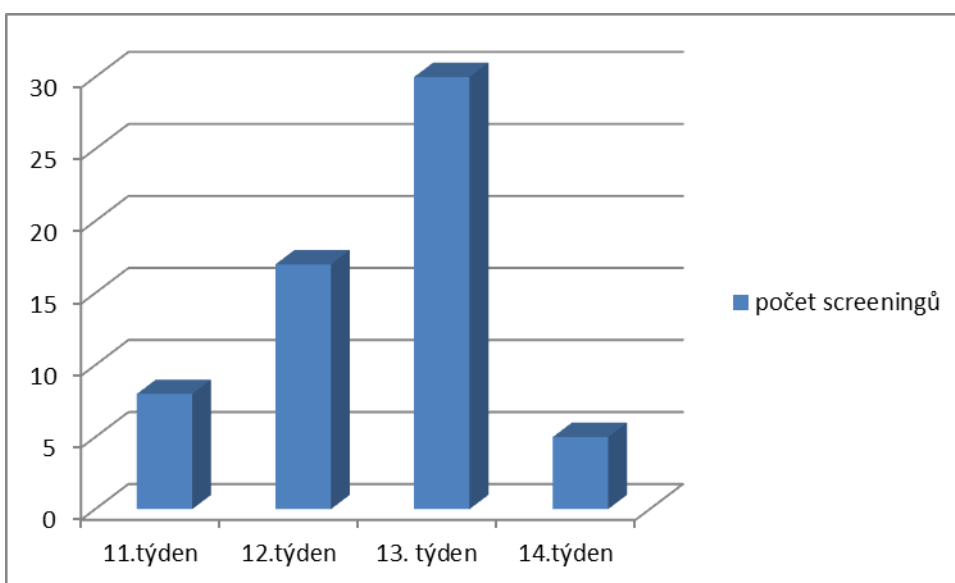
číslo vzorku	věk	hmotnost [kg]	gestační stáří	free-β hCG [UI/L]	free-β hCG [MoM]	PAPP-A [UI/L]	PAPP-A [MoM]	CRL [mm]	NT [mm]	riziko trizomie2 1	riziko trizomie 18	riziko trizomie 13	výsledek
21	26	54	13t+6	82,4	2,609	7,265	1,050	79	2,0	1:3152	1:289276	1:680973	negativní
22	29	81	14t+0	18,9	0,831	3,850	0,829	82	1,8	1:19242	1:227093	1:534589	negativní
23	30	65	13t+2	67,8	2,257	3,742	0,819	71	1,8	1:1580	1:203516	1:479087	negativní
24	29	53	13t+0	11,1	0,309	6,155	1,180	68	1,7	1:18938	1:182308	1:526146	negativní
25	34	86	13t+6	9,0	0,374	1,340	0,375	79	2,1	1:8406	1:3678	1:4710	negativní
26	23	85	11t+4	52,2	1,520	0,943	0,564	49	1,6	1:17588	1:338501	1:796851	negativní
27	29	67	12t+4	49,1	1,525	3,702	1,107	62	1,8	1:18312	1:216127	1:508774	negativní
28	26	58	13t+3	35,2	1,177	1,440	0,325	73	1,8	1:1067	1:73055	1:24932	negativní
29	30	65	13t+2	31,4	1,081	7,105	1,544	72	2,0	1:17278	1:203917	1:480032	negativní
30	28	68	13+2	19,3	0,686	4,503	1,030	72	1,5	1:20987	1:247687	1:583070	negativní
31	29	67	12t+6	39,9	1,306	4,406	1,173	66	1,8	1:16461	1:233350	1:549319	negativní
32	26	66	12t+3	79,1	2,272	1,447	0,457	59	1,5	1:2037	1:287432	1:313809	negativní
33	35	75	13t+3	38,2	1,471	6,608	1,651	73	1,6	1:6698	1:79051	1:186091	negativní
34	34	63	13t+1	53,5	1,762	7,604	1,687	70	2,2	1:7669	1:94138	1:221605	negativní
35	27	94	13t+1	14,4	0,633	3,623	1,304	70	1,9	1:22492	1:265452	1:624888	negativní
36	34	124	12t+5	28,0	1,299	0,915	0,536	63	2,1	1:1462	1:94219	1:69912	negativní
37	37	69	13t+2	57,7	2,048	3,583	0,857	71	2,1	1:750	1:49596	1:116752	negativní
38	29	67	12t+3	22,8	0,664	3,368	1,082	59	1,6	1:20282	1:239367	1:563484	negativní
39 (fetus1)	32	101	12t+3	63,8	1,215	4,103	1,008	59	2,1	1:3636	1:156605	1:265270	negativní
39 (fetus2)								57	1,8	1:9219	1:156605	1:362658	negativní
40	27	71	12t+4	11,1	0,360	1,268	0,406	62	1,4	1:23162	1:12685	1:13007	negativní

číslo vzorku	věk	hmotnos t [kg]	gestační stáří	free-β hCG [UI/L]	free-β hCG [MoM]	PAPP-A [UI/L]	PAPP-A [MoM]	CRL [mm]	NT [mm]	riziko trizomie2 1	riziko trizomie 18	riziko trizomie 13	výsledek
41	32	61	11t+2	203,2	4,530	3,340	1,530	45	1,0	1:7011	1:13648	1:16588	negativní
42	28	132	11t+2	58,0	3,560	1,100	0,820	47	1,9	1:480	1:8654	1:69465	negativní
43	30	62	12t+5	77,1	2,329	3,425	0,885	64	1,1	1:2407	1:201428	1:474172	negativní
44	31	67	12t+5	12,7	0,399	1,689	0,490	63	1,3	1:15661	1:24941	1:36659	negativní
45	37	65	12t+4	12,9	0,391	0,744	0,215	0,62	1,5	1:778	1:158	1:499	pozitivní
46	36	73	13t+3	37,3	1,409	3,347	0,810	73	1,9	1:2594	1:64324	1:151423	negativní
47	29	57	13t+5	12,3	0,405	2,490	0,409	77	2,1	1:18831	1:16931	1:18457	negativní
48	33	76	13t+0	35,9	1,304	3,652	1,096	67	2,1	1:10297	1:121530	1:286088	negativní
49	26	72	13t+2	10,3	0,369	1,681	0,414	71	1,8	1:24639	1:15833	1:24280	negativní
50	29	74	12t+6	24,5	0,845	1,942	0,569	66	1,5	1:7613	1:215120	1:152302	negativní
51	29	116	13t+1	25,3	1,324	1,233	0,722	69	2,0	1:7426	1:225032	1:525541	negativní
52	35	114	12t+5	9,5	0,438	1,822	1,026	65	2,5	1:1421	1:55393	1:37152	negativní
53	34	73	13t+2	36,3	1,341	9,404	2,403	71	3,6	1:115	1:2625	1:3532	pozitivní
54	29	52	13t+0	41,8	1,168	3,111	0,614	67	2,0	1:7802	1:218181	1:291889	negativní
55	22	62	11t+3	123,1	3,120	2,263	0,850	67	1,8	1:1500	1:16523	1:40659	negativní
55	28	67	11t+4	30,8	0,753	1,999	0,898	49	1,2	1:21114	1:249197	1:586614	negativní
56	35	76	13t+3	24,4	0,949	0,818	0,208	73	2,1	1:185	1:1455	1:618	pozitivní
57	22	48	13t+3	82,9	2,380	6,525	0,982	74	1,5	1:3471	1:348572	1:820560	negativní
58	33	49	12t+5	35,2	0,910	2,744	0,588	64	1,8	1:7306	1:114395	1:102560	negativní
59	30	85	14t+0	8,6	3,560	1,653	0,382	83	2,1	1:16987	1:6839	1:9606	negativní
60	26	57	13t+3	71,8	2,348	4,249	0,897	74	2,3	1:2139	1:289886	1:679644	negativní

Graf č. 1 Podíl pozitivní a negativních výsledků screeningu v I. trimestru



Graf č. 2 Počet screeningových vyšetření v I. trimestru podle gestačního stáří



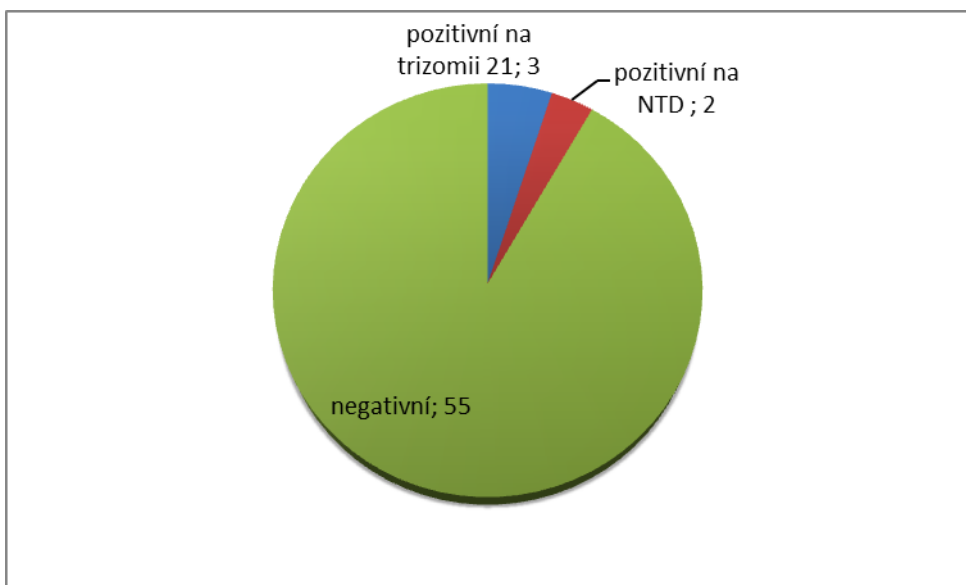
1. Tabulka č. 3 výsledky screeningu ve 2. trimestru

číslo vzorku	věk	hmotnost [kg]	gestační stáří	AFP [ng/ml]	AFP [MoM]	hCG [KIU/L]	hCG [MoM]	riziko Down.Sy	riziko NTD	výsledek
1	19	53	15t+4	29,20	0,81	22,637	0,73	1:7600	1:9000	negativní
2	22	49	15t+5	36,80	0,96	129,979	4,19	1:85	1:90000	pozitivní
3	23	59	15t+4	53,30	1,57	78,589	2,68	1:2000	1:2700	negativní
4	26	64	16t+1	22,50	0,64	35,449	1,40	1:490	1:12000	negativní
5	27	60	16t+4	39,40	1,02	19,507	0,79	1:13000	1:11000	negativní
6	30	59	15t+6	24,20	0,68	22,979	0,83	1:1800	1:9000	negativní
7	34	79	16t+6	25,80	0,78	20,707	1,20	1:820	1:12000	negativní
8	32	55	15t+6	40,00	1,08	18,971	0,66	1:14000	1:8000	negativní
9	20	62	16t+1	35,10	0,98	21,750	0,84	1:11000	1:12000	negativní
10	19	55	20t+0	51,60	0,79	22,073	1,06	1:2600	1:10000	negativní
11	27	64	15t+0	23,80	0,80	107,049	3,36	1:75	1:9000	pozitivní
12	16	47	18t+2	48,00	0,86	4,861	0,21	1:46000	1:14000	negativní
13	28	68	16t+6	36,00	0,97	39,644	1,78	1:1000	1:12000	negativní
14	30	73	15t+4	39,70	1,01	29,700	1,01	1:3000	1:8900	negativní
15	30	76	15t+6	27,80	0,94	24,397	1,01	1:3600	1:9000	negativní
16	23	60	16t+5	32,80	0,83	13,865	0,57	1:16000	1:12000	negativní
17	24	54	17t+3	75,90	1,64	13,773	0,58	<1:50000	1:3500	negativní
18	23	69	22t+2	99,47	1,18	11,494	0,78	1:28000	1:4200	negativní
19	28	68	16t+6	35,30	0,95	11,362	0,51	1:29000	1:12000	negativní
20	31	58	16t+0	39,20	1,07	17,801	0,65	1:18000	1:11000	negativní

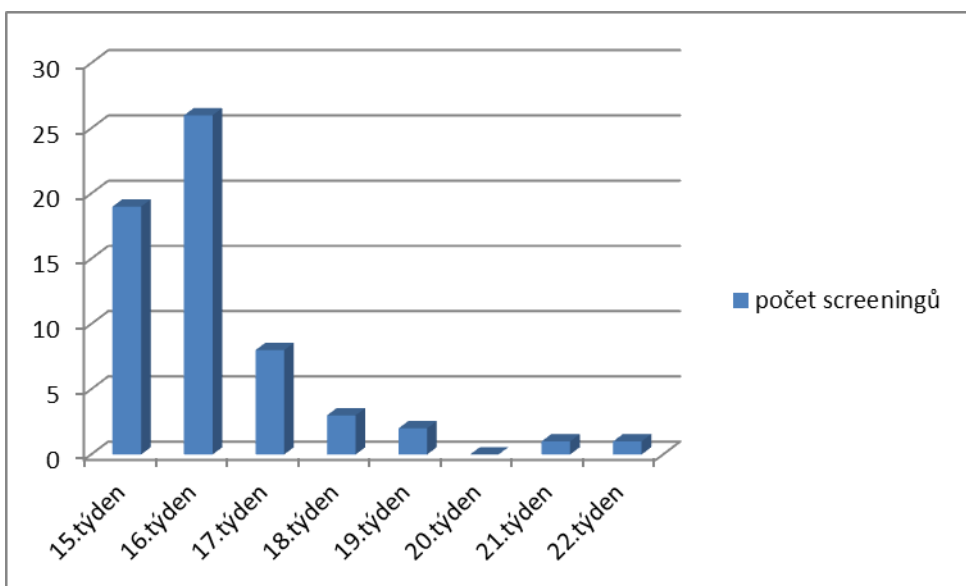
číslo vzorku	věk	hmotnost [kg]	gestační stáří	AFP [ng/ml]	AFP [MoM]	hCG [KIU/L]	hCG [MoM]	riziko Down.Sy	riziko NTD	výsledek
21	19	61	16t+4	39,60	1,03	33,326	1,34	1:3600	1:11000	negativní
22	28	81	15t+3	40,60	1,53	31,169	1,25	1:16000	1:2900	negativní
23	32	105	16t+0	27,40	1,23	17,796	0,97	1:7700	1:8400	negativní
24	28	82	15t+4	36,30	1,36	14,031	0,58	<1:50000	1:4700	negativní
25	32	74	16t+0	26,50	0,86	22,255	0,93	1:2600	1:12000	negativní
26	27	60	16t+0	92,00	2,57	66,120	2,46	1:15000	1:110	pozitivní
27	30	58	16t+2	23,50	0,62	22,356	0,86	1:1200	1:12000	negativní
28	18	53	15t+4	35,09	1,11	5,962	0,17	<1:50000	1:7700	negativní
29	27	70	16t+2	17,00	0,51	16,142	0,68	1:1300	1:12000	negativní
30	16	72	18t+2	21,90	0,51	14,811	0,77	1:1100	1:14000	negativní
31	32	72	16t+3	40,20	1,20	24,346	1,07	1:6200	1:8700	negativní
32	28	86	16t+1	35,50	1,28	15,753	0,75	1:34000	1:7500	negativní
33	35	54	17t+3	53,20	1,15	26,279	1,11	1:2200	1:1100	negativní
34	26	58	15t+3	41,60	1,23	27,397	0,90	1:19000	1:6100	negativní
35	26	61	16t+3	28,60	0,76	20,730	0,83	1:3700	1:12000	negativní
36	22	62	17t+1	75,40	1,84	21,938	0,97	<1:50000	1:1800	negativní
37	27	67	16t+0	27,10	0,82	22,823	0,90	1:3800	1:12000	negativní
38	17	47	15t+0	57,84	1,89	58,412	1,35	1:37000	1:960	negativní
39	30	69	16t+3	35,00	1,01	19,954	0,86	1:8000	1:11000	negativní
40	29	55	16t+5	31,95	0,85	31,254	1,24	1:1600	1:12000	negativní

číslo vzorku	věk	hmotnost [kg]	gestační stáří	AFP [ng/ml]	AFP [MoM]	hCG [KIU/L]	hCG [MoM]	riziko Down.Sy	riziko NTD	výsledek
41	27	57	17t+5	29,30	0,63	24,736	1,10	1:810	1:13000	negativní
42	24	85	16t+2	35,60	1,24	26,028	1,25	1:8300	1:8100	negativní
43	27	64	16t+5	35,90	0,95	19,537	0,83	1:8200	1:12000	negativní
44	29	94	15t+4	21,40	0,91	57,085	2,62	1:220	1:9000	pozitivní
45	19	53	16t+3	26,80	0,66	36,541	1,37	1:640	1:12000	negativní
46	25	57	17t+0	57,80	1,37	22,473	0,93	1:27000	1:7400	negativní
47	31	65	15t+6	23,20	0,70	25,502	0,97	1:1200	1:9000	negativní
48	27	51	18t+0	58,80	1,14	11,119	0,48	<1:50000	1:12000	negativní
49	43	64	17t+6	64,40	1,45	18,554	0,88	1:1500	1:5900	negativní
50	21	54	17t+3	59,10	1,28	20,360	0,86	1:16000	1:9000	negativní
51	25	92	16t+2	30,60	1,15	36,957	1,89	1:1800	1:9600	negativní
52	22	64	21t+2	56,75	0,76	9,172	0,58	1:11000	1:6800	negativní
53	25	64	15t+5	39,21	1,35	63,280	2,12	1:2300	1:4700	negativní
54	29	65	16t+4	32,00	0,87	26,777	1,13	1:2100	1:1200	negativní
55	20	69	20t+0	51,60	0,91	10,994	0,60	1:20000	1:9500	negativní
56	32	63	15t+1	30,90	1,00	34,854	1,12	1:2600	1:8900	negativní
57	21	57	16t+0	124,64	3,81	43,156	1,47	<1:50000	1:3	pozitivní
58	28	60	15t+5	41,51	1,37	21,085	0,68	<1:50000	1:4500	negativní
59	25	62	15t+2	42,72	1,61	29,052	0,86	<1:50000	1:2500	negativní
60	33	62	17t+1	50,70	1,24	24,813	1,09	1:5200	1:9600	negativní

Graf č. 3 Podíl pozitivní a negativních výsledků screeningu v II. trimestru



Graf č. 4 Počet screeningových vyšetření v II. trimestru podle gestačního stáří



Tabulka č. 4 Statistika prenatalních screeningových testů prováděných Genetikou s.r.o. za rok 2011

Výsledek screeningu	Příčina	Počet vyšetření	V procentech
pozitivní	zvýšené riziko Downova syndromu	79	4,1%
pozitivní	zvýšené AFP	33	1,7%
negativní	(pro Downův syndrom a NTD)	1498	78,4%
negativní	(pouze pro Downův syndrom)	301	15,8%
Celkový počet vyšetření		1911	100,0%

2 testy byly pozitivní na trizomii 18.

Tabulka č. 5 Statistika screeningových testů v r. 2011 prováděných Genetikou s.r.o. podle typu

Typ testu	Počet	V procentech
Test v prvním trimestru	307	16,1%
Test v druhém trimestru	929	48,6%
Integrovaný test	675	35,3%
celkový počet	1911	100%

5. Diskuse

Pro svou bakalářskou práci jsem měřila 60 vzorků pro screening v 1. trimestru a 60 vzorků pro screening ve druhém trimestru. Z grafů je patrné, že prvotrimestrový screening je nejčastěji prováděn ve 13. týdnu těhotenství, zatímco screening ve druhém trimestru nejčastěji kolem 16. týdne. Ze svého původního záměru provádět obě screeningová vyšetření u jedné pacientky a případně vyhodnocovat jejich kombinaci jsem musela upustit, protože pracoviště, se kterými jsem spolupracovala, vyšetřují těhotnou ženu jen jednou a podle gestačního stáří plodu provádějí buď screening v prvním, nebo ve druhém trimestru. Pokud byl proveden screening v 1. trimestru, není důvod pro další vyšetřování, které pro ženu představuje stres při čekání na výsledek. Je to také známkou pokroku v prvotrimestrovém screeningu, který je ještě v literatuře z přelomu tisíciletí popisován jako nový, ve fázi ověřování (20). Nyní už se využívá jako zcela ověřená metoda, která je již prakticky stejně spolehlivá jako screening ve druhém trimestru. V doporučení z roku 2010 je navíc navrhováno, aby se základní strategie opírala o screening v prvním trimestru (2,8). Myslím, že je to krok správným směrem. V případě pozitivního screeningu a možného odhalení vrozené vady je v pozdějších fázích těhotenství nejen rizikovější případná interrupce, ale také je to větší psychická zátěž pro ženu, která si postupně vytváří k zárodku citovou vazbu. Závisí však na uvážení ošetřujícího lékaře zda těhotná žena podstoupí jedno nebo obě screeningová vyšetření. Někteří autoři zastávají názor, že nejvhodnější je kombinace obou vyšetření v integrovaném testu, který má největší sensitivitu a tím i nejvyšší procento zachycení vrozených vývojových vad plodu. Zároveň disponuje nejnižší mírou falešné negativity (29).

Stanovení biochemických markerů se provádí z krevního séra. Správnost měření závisí na mnoha faktorech. Velmi důležitá je preanalytická fáze, především správný odběr a transport. Chyba v této fázi se velmi špatně dohledává, přitom může být pro výsledek fatální. Důležitá je i kontrola kvality a to jak vnitřní prováděná pracovníky laboratoře, tak externí. Velmi důležitý je i přístup pracovníků laboratoře a jejich kvalifikace. Dále je třeba dbát na co nejrychlejší vlastní analýzu, neboť stabilita v séru se při 20 °C uvádí u free-β-hCG 6 hodin, u ostatních markerů 12 hodin.

Je také třeba brát v úvahu, že v celém procesu screeningového vyšetření, od odběru krve těhotné ženy až po určení výsledného rizika, je nutná spolupráce celkem tří zdravotnických pracovišť. V první fázi ambulance gynekologa, kde probíhá samotný odběr a ultrazvuková část screeningu, poté laboratoř biochemie, kde se stanovuje hodnota biochemických parametrů a nakonec pracoviště genetiky, kde probíhá samotné vyhodnocení rizika vrozených vývojových vad u dané pacientky a případné další genetické poradenství. Je tedy nutná komunikace mezi pracovišti a kompletní dokumentace kvůli řešení případných nejasností. Chyba v jedné fázi procesu může zcela znehodnotit celkový výsledek testu.

Podle informací z literatury i z laboratoře Genetiky Plzeň s.r.o. je počet pozitivních screeningů 5-7%. Z celkového počtu 120 testů bylo na vrozené vývojové vady pozitivních celkem 8 testů, což odpovídá 9,6 %. Jde tedy o výsledek mírně nad průměrem. Je to dáno poměrně malým počet sledovaných vzorků. Z 60 vzorků vyšetřovaných v prvním trimestru byly 2 vzorky pozitivní na riziko trizomie 21. chromozomu a jeden na trizomii 18. chromozomu. Pacientkám s pozitivním testem se v této fázi těhotenství nabízí metoda biopsie choria, fetální buňky jsou kultivovány pro určení karyotypu, případně vyšetřovány moderní metodou QF-PCR. Z 60 vzorků vyšetřovaných ve druhém trimestru bylo pozitivních celkem 5, z toho 3 na riziko Downova syndromu a 2 na defekty neurální trubice. V tomto případě se navrhuje aminocentéza, tedy odběr plodové vody pro kultivaci buněk pro určení karyotypu plodu a stanovení hladiny AFP v plodové vodě. V případě rizika defektů neurální trubice jsou nutná další, podrobnější vyšetření ultrazvukem.

V laboratoři OKB Privamed a.s. v Plzni jsem z biochemických markerů pro 2. trimestr. Vyšetřovala pouze AFP a total hCG, přestože se doporučuje také vyšetřování nekonjugovaného estriolu (8,37). Důvodem je nedostupnost kitu na stanovení uE3 pro přístroj Elecsys®2010 a velká citlivost uE3 na preanalytiku. Zejména v zahraniční literatuře bylo doporučováno stanovení inihinu A, pro větší přesnost (11), ani ten ale není laboratoři OKB Privamed vyšetřován.

Screeningové vyšetření ve druhém trimestru se doporučuje provádět ve 14. -17. týdnu těhotenství, za optimální je považován 16. týden. Vzorky, které jsem měřila byly často nabrány později (ve dvou případech až po 20. týdnu těhotenství). Jde zpravidla o

ženy, které se dříve na odběr nedostavily. Domnívám se, že je důležité, aby žena screeningový test i přesto absolvovala, i když je třeba počítat s tím, že screeningový test již není tak přesný.

6. Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na prenatalní screening vrozených vývojových vad plodu, který se provádí u těhotných žen. Zaměřila jsem se na stanovování biochemických markerů, které jsem ve své práci popsala. Seznámila jsem se i se základními genetickými diagnostickými metodami, jejichž nejčastější indikací je právě pozitivní screening. Při studiu literatury jsem se seznámila s úrovní současných poznatků o těhotenském screeningu a rizikových faktorech vrozených vývojových vad. Pracovala jsem s náhodně vybranými patientskými vzorky z rutinního provoyu biochemické laboratoře Městské nemocnice Privamed a.s. v Plzni. Podrobně jsem se seznámila se zásadami uchování vzorků a prací s nimi. Pracovala jsem se s analyzátozem Elecsys®2010, seznámila jsem se s jeho ovládáním a principem vlastní analýzy metodou elektrochemiluminiscence.. Naučila se pracovat s programem Alpha, který slouží k vyhodnocování získaných dat.

Pro svou práci jsem provedla měření celkem 120 náhodně vybraných vzorků, z toho 60 pro screening v prvním trimestru těhotenství a 60 pro screening ve druhém trimestru těhotenství. Vzorky jsem měřila na analyzátoru Elecsys®2010. Naměřené hodnoty jsem vyhodnotila v programu Alpha, spolu s dalšími údaji o pacientce (věk, hmotnost) a parametry vyšetření ultrazvuku.

Ve vzorcích vyšetřovaných pro screening v prvním trimestru byly z 60 vzorků 3 pozitivní, z toho 2 byly pozitivní na trizomii 21. chromozomu a 1 na trizomii 18. chromozomu. Ve vyšetření vzorků pro druhý screening těhotenství bylo pozitivních 5 vzorků z 60. Z pozitivních vzorků byly 3 pozitivní na trizomii 21. chromozomu a 2 na defekty neurální trubice. Pacientky s pozitivním výsledkem podstoupily další diagnostiku.

Screening vrozených vývojových vad se dnes běžně provádí u všech těhotných žen. Používají se již plně prověřené metody, které se ale stále vyvíjejí. Stále více se upřednostňuje vyšetření v prvním trimestru těhotenství. Jsem přesvědčená, že by každá těhotná žena měla projít alespoň jedním screeningovým testem, který jí poskytne informaci o stavu jejího plodu. V případě negativního výsledku ji informace uklidní, v případě pozitivního umožní další diagnostiku a včasné další řešení.

7. Seznam použité literatury

- (1) AGOPIAN A. J., LUPO PHOLIP J., TINKEK SARAH C., et al: Working towards a risk prediction model for neural tube defect, 2012, 3, 141-146
- (2) BAHADO-SINGH,R.O., SUTTON-RILEY,J.: Biochemical screening for congenital defects, 2004,4,857-863
- (3)BLAŽEK R.: Elecsys – nová generace systému pro imunodiagnostiku. Labour actuell, 1997, 02, 4-5
- (4) BLAŽKOVÁ I.: OKB Příručka: Popis imunochemického analyzátoru Elecsys 2010 a jeho obsluhy[online], 2008 [cit. 2012-06-5],
Dostupné z: http://www.hospital-pe.cz/dok/okb_prirucka/HVEZDABAAO.htm
- (5) BRYCHTOVÁ S., MUSILOVÁ V: Prenatální screening vrozených vývojových vad –Elecsys 2010, Labour Aktuell, 2004, 04,18-20
- (6) BENEVENTI,F., SIMONETTA, M., LOVATI, E. et al.: First trimester pregnancy-associated plasma protein-A in pregnancies complicated by subsequent gestational diabetes. Prenatal diagnosis, 2011, 6, 523-528
- (7) CALDA P., BŘEŠŤÁK M., ČECH E., et al: Ultrazvuková diagnostika v těhotenství. 1. vyd Praha, Aprofema, 2007, 270s
- (8) CALDA P.: Návrh doporučení provádění prenatálního screeningu trizomie[online], 21. 2010, leden
Dostupný z: www.perinatologie.cz/dokumenty/doc/doporucene.../DP%20Down.p...v
- (9) COLLINS S. L.IMPEY L.: Prenatal diagnosis: Types and techniques. Early human debelopment, 2012,1, 3-8
- (10) COWANS N. J., STAMATOPOULOU A., TORRING. et al.: Early first-trimester maternal serum placental growth factor in trisomy 21 pregnancies. Ultrasound in obstetrics & gynecology, 2011, 5, 515-519
- (11) CUCLE H. S., HOLDING S. JONES R. et al.: Combining inhibin A with existing second trimester Down's syndrome pregnancies. Prenatal Diagnosis, 1996, 1095 -1100
- (12) ČECH E., HÁJEK Z., MARŠÁL K., et al.: Moderní porodnictví. 1.Vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2008, 405s., ISBN 978-80-247-1303
- (13) DARMES D., HASHMI S., MONGA M., et al.: First-trimester screening and its impact on uptake of diagnostic testing. Prenatal diagnosis, 2011, 9, 892-896
- (14) DASTYCH M., BEŇOVSKÁ M., BREINEK P., et al.: Klinická biochemie 1.Vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2008, 232s., ISBN 978-80-210-4572-9

- (15) DORIAN J. P., BRUCE R. K.: Základy lékařské genetiky. 1. vyd Praha, Galén, 2007,183s ISBN 978-80-7262-449-2
- (16) DE MARCO P., MERELLO E., AMMANDO C, et al: Human neural tube defects: Genetics causes and prevention. BIOFACTORS, 2011, 4,261-268
- (17) DERBENT A.U., YANIK F. F., SIMAVIL S., et al.: First trimester maternal serum PAPP-A and free beta-HCG levels in hyperemesis gravidarum. Prenatal diagnosis, 2011, 5, 450-453
- (18) FUCHS V., ZOBAN P., TOMÁŠOVÁ H., ČERNÝ M.: *Vybrané kapitoly z perinatologie*. 1. vyd. Praha Karolinum, 2001.329 s, ISBN 80-246-0114-1
- (19) FRIDECKÝ B., ŠPRONGL L., KRATOCHVÍLA J.: Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích, [online],ČSKB,2004[cit. 2012-07-20],
- (20) HÁJEK Z., KULOVANÝ E., MACEK M: *Základy prenatalní diagnostiky*. 1. Vyd. Praha: Grada Publishing, 2000. 423 s., ISBN 80-7169-391
- (21) HÁJEK, Z.et al., *Rizikové a patologické těhotenství*. 1. Vyd. Praha: Grada 2004. 443, ISBN 80-247-0418-8
- (22) HAWK A. F., PASTORE L., SALLER D. N.: Genetic screening in university clinic: impact of primary language. Prenatal diagnosis, 2011, 9, 846-852
- (23) JAUDI S., DU MONTCEL S. T., FRIES N., et al.: Online evaluation of fetal second-trimester four-chamber view images: a comparison of six evaluation methods. Ultrasound in obstetrics & gynecology, 2011, 2, 185-190
- (24) LOŠAN P.: Laboratorní příručka. Genetika Plzeň s.r.o.,2010
- (25) KANTZ D., HALLAHAN T., RAVENS R., et al.: First trimester Down syndrome screening with dried blood spots using a dual analyte free beta HCG and PAPP-A immunofluorometric assay. Prenatal diagnosis, 2011, 9, 869-874
- (26) KIRKEGAARD I., HENRIKSEN T. B., TORRING N., et al.: PAPP-A and free beta HCG measured prior to 10 weeks is associated with preterm delivery and small-for-gestational-age infants. Prenatal diagnosis, 2, 171-17
- (27) KYPROS H. N.: UZ screening v 11.13⁺⁶. Gestačním týdnem. 1. Vyd Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci 2004, 118s, ISBN 80-244-0885-6
- (28) MÁLKOVÁ K.: Méně známé možnosti využití diagnostických markerů; 1.díl: PAPP-A: dvojí tvář jednoho markeru

- (29) MALONE F.D., CANICK J.A., BALL R.H.: First-trimester or second trimester screening, or both, for Down's syndrome, New England journal of medicine, 2005,19, 2001/2011
- (30) MIRON P.: First-trimester stepwise sequential prenatal screening for Down syndrome using NT and maternal age. Prenatal diagnosis, 2011, 9, 915-916
- (31) MONTAG M., TOTH B., STROEITZKI T.: Polkörperdiagnostik. Numerische und strukturelle Analyse von Chromosomenaberration, Medizinische Genetik, 2011, 14, 479-482
- (32) NEZVEDOVÁ M. VEŠKRNA Z: Stanovení PAPP-A a freeβhCG na analyzátoru Elecsys®2010, Labour Aktuell 2010,04, příloha 1-6
- (33) NUSSBAUM R.L., MCINNES R.R., WILLARD H.F., et al : Klinická genetika, 1. vyd, Praha, Triton, 2004, 42 ISBN 80-7254-475-6
- (34) OTOVÁ B., KOHOUTOVÁ M., LIŠKA F., HIHALOVÁ R., ŠEDA O.: Lékařská biologie a genetika (I.díl), 1.vyd. Praha: Universita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, 2008, 123s. ISBN 978-80-246-1594-3
- (35) PÁNEK J.: Laboratorní příručka OKB Privamed[online]. 2011 [cit. 2012-06-18] Dostupné z: <http://www.privamed.cz/okb-lp.htm>
- (36) Poznámky k manuálu programu ALPHA Verse 7[online]. 2012 [cit. 2012-06-18]. Logical Medical Systems. Dostupné z: <http://www.gennet.cz/sqlcache/alpha-manual-2012.pdf>
- (37) RACEK J., EISELT J., FRIEDECKY B., et al.: Klinická biochemie. 2 Vyd. Praha : Galén, 2006, 329s. ISBN 80-7262-342-9
- (38) Roche Diagnostic [online]. 2012 [cit. 2012-06-18]. Elecsys AFP. Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/04481798p.pdf>
- (39) Roche Diagnostic [online]. 2012 [cit. 2012-06-18]. Elecsys CleanCell. Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/04481798p.pdf>
- (40) Roche Diagnostic [online]. 2011 [cit. 2012-06-18]. Elecsys free beta-HCG. Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/04854071p.pdf>
- (41) Roche Diagnostic [online]. 2012 [cit. 2012-06-18]. Elecsys hCG. Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/05390125p.pdf>

- (42) Roche Diagnostic [online]. 2012 [cit. 2012-06-18].Elecsys PAPP-A . Dostupné z:
<http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/04854098p.pdf>
- (43) Roche Diagnostic [online]. 2012 [cit. 2012-06-18].Elecsys PAPP-A CalSet .
Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/04854101p.pdf>
- (44) Roche Diagnostic [online]. 2012 [cit. 2012-06-18].ElecsysProCell. Dostupné z:
<http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/11662988p.pdf>
- (45) ROZTOČIL A., BINGER T., BOREK I., et al.: Moderní porodnictví. 1.Vyd. Praha: Grada Publishing, 2008, 408s., ISBN 80-247-0418-8
- (46)SNUSTAD D.P., SIMMONS M. J.: Genetika. 1.Vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2009, 871s., ISBN 978-80-210-4852-2
- (47)SRŠEŇ Š., SRŠŇOVÁ K.: Základy klinickéj genetiky a jej molekulárna podsata. 4. Vyd. Martin: Osveta, 2005,445s., ISBN 80-8063-185-9
- (48) SUCHÁNEK M., FRIDECKÝ B., KRATOCHVÍLA J.,et al.:Doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků měření/klinických testů v klinických laboratořích. Klinická biochemie a metabolismus,2006,1, 43-53
- (49) ŠÍPEK A.:QFPCR- nová metoda prenatalní diagnostiky[online], 2009, 10 [cit.2012-06-12]
Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/qfpcr-nova-metoda-prenatalni-diagnostiky/>
- (50) ŠTERN P., RENDLOVÁ J.: Elecsys 2010 v imunodiagnostické laboratoři. Labour Actuell, 1997, 02, 6-9
- (51)WALD N.J. at al. First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome:the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS), Health Technol Assess 2003,7, 11-15
- (52) Yang Z., Fu Z., Yan F et al : A chemiluminescent immunosensor based on antibody immobilized carboxylic resin beads coupled with micro-bubble accelerated immunoreaction for fast flow-injection immunoassay, Biosensors and Bioelectronic, 2008, 1, 35-40

(53) ZHANG J., LAMBERT-MESSERLIAN G., PALOMAKI G. E., et al.: Impact of smoking on maternal serum markers and prenatal screening in the first and second trimesters. *Prenatal diagnosis*, 2011, 6, 583-588

(54) ZWINGER A. et al.: *Porodnictví*. 1.vyd. Praha: Galén, 2004, 532s. ISBN 80-7262-257-9

8. Klíčová slova

Alfafetoprotein

Biochemické markery těhotenského screeningu

Choriogonadotropní hormon

Laboratorní metody

Plazmatický protein A

Screening v těhotenství

Vrozené vývojové vady

Key words

Alpha-fetoprotein

Biochemical markers of pregnancy screening

Chorio-gonadotropic hormone

Laboratory methods

Plasma protein A

Screening in pregnancy

Congenital developmental anomalies

9. Přílohy

Tabulka č. 6: Odhad rizika výskytu trizomií 21., 18., a 13. chromozomu v závislosti na věku matky a délce gestace (riziko 1:číslo uvedené v tabulce)

věk matky (roky)	trizomie 21				trizomie 18				trizomie 13			
	délka gestace (týdny)				délka gestace (týdny)				délka gestace (týdny)			
	12	16	20	40	12	16	20	40	12	16	20	40
20	1068	1200	1295	1527	2484	3590	4897	18013	7826	11042	14656	42423
25	946	1062	1147	1352	2200	3179	4336	15951	6930	9778	12978	37567
30	626	703	759	895	1456	2103	2869	10554	4585	6470	8587	24567
31	543	610	658	776	1263	1825	2490	9160	3980	5615	7453	21573
32	461	518	559	659	1072	1549	2114	7775	3378	4766	6326	18311
33	383	430	464	547	891	1287	1755	6458	2806	3959	5254	15209
34	312	350	378	446	725	1047	1425	5256	2284	3222	4277	12380
35	249	280	302	356	580	837	1142	4202	1826	2576	3419	9876
36	196	220	238	280	456	659	899	3307	1437	2027	2691	7788
37	152	171	185	218	354	512	698	2569	1116	1575	2090	6050
38	117	131	142	167	272	393	537	1974	858	1210	1606	4650
39	89	100	108	128	208	300	409	1505	654	922	1224	3544
40	68	76	82	97	157	227	310	1139	495	698	927	2683
41	51	57	62	73	118	171	233	858	373	526	698	2020
42	38	43	46	55	89	128	175	644	280	395	524	1516

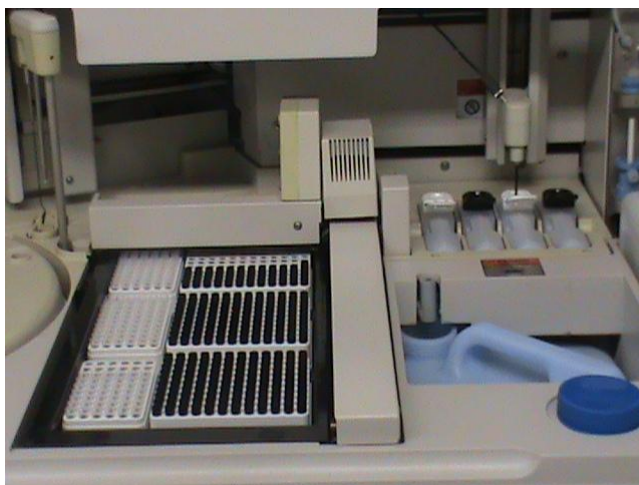
Zdroj (27)

Obr. 1 Fotografie přístroje Roche Elecsys 2010



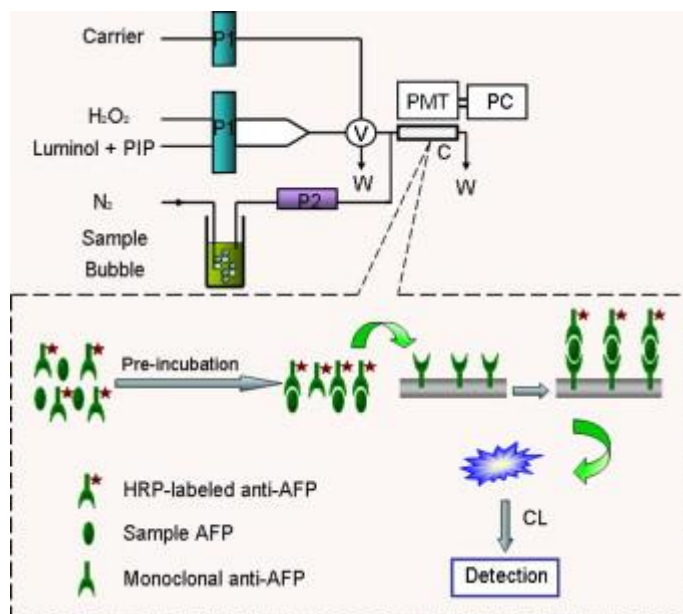
Zdroj : Vlastní foto

Obr 2. Přístroj Roche Elecsys – inkubace



Zdroj : Vlastní foto

Obr 3. Princip elektrochemiluminiscence



Zdroj (52)

Obr. 4 Žádanka pro screening v I. trimestru

Screeningové centrum – Genetika Plzeň, s.r.o.

SCREENING I. trimestru - biochemické vyšetření: PAPP-A, free B hCG

Odesílající lékař (razítko vč. IČZ)	Odběr krve: není nutné nalačno! provést v graviditě 10 + 1 – 13 + 6
Jméno, příjmení těhotné:	Diagnóza:
Rodné číslo:	Datum odběru:
Pojišťovna:	

Screeningové centrum – Genetika Plzeň, s.r.o.

SCREENING I. trimestru - USG vyšetření

Odesílající lékař (razítko vč. IČZ)	USG vyšetření: CRL: 45–84 (11 + 3 – 13 + 6) dle Robinsona Posun kaliperu: 0,1 mm Sagitální řez – indiferentní postavení Obraz hlavy plodu přes 3/4 obrazovky
Jméno sonografisty:	

Jméno, příjmení těhotné:	PM:
Rodné číslo:	Hmotnost těhotné: kg
Pojišťovna:	Počet plodů:
Datum USG:	Kouření ANO NE
USG přístroj:	IVF/ICSI ANO NE
	Parita:
	CRL 1: mm CRL 2: mm
	NT 1: mm NT 2: mm
	NB 1: ANO NE NELZE NB 2: ANO NE NELZE

*POZOR: Výsledek USG vyšetření poslat na: Genetika Plzeň, s.r.o., Nepomucká 159/A, 32600 Plzeň
Výsledek screeningu zašleme do 5 dnů*

Zpracováno pro lékaře:

Obr. 5 Žádanka pro screening ve II. Trimestru

Genetika Plzeň		Číslo vzorku	
Datum		+420 377 241 529	
Rodné číslo	/	Jméno lékaře	Pracoviště
Příjmení			
Jméno		IČZ	Odbornost
Pojišťovna			
Diagnóza hlavní	Diagnóza vedlejší	Telefon (pacientka)	
		➔ <input type="text"/> ⬅	

Screening VVV II. trimestr AFP, hCG	Výsledky vyšetření		
Hmotnost těhotné (kg)	<input type="text"/>	S - AFP (ng/ml)	<input type="text"/>
PM	<input type="text"/>	S - hCG (IU/l)	<input type="text"/>
Délka těhotenství (týdny) dle PM	<input type="text" value="+"/> +		
Délka těhotenství (týdny) dle USG	<input type="text" value="+"/> +		
Datum náběru	<input type="text"/>		
Počet plodů	<input type="text" value="1"/> / <input type="text" value="2"/> / <input type="text" value="3"/>		
Diabetes mellitus	ANO <input type="text"/>		
	NE <input type="text"/>		

**Krev na screening VVV zašlete
do OKB Privamed, Kotíkovská 17 PLZEŇ**

www.genetika-plzen.cz Genetika Plzeň, s.r.o.
Nepomucká 159/A, Plzeň-Černice 326 00

Obr. 6 Verifikační protokoly k jednotlivým metodám

a) verifikační protokol metody PAPP-A

Verifikační protokol

Analyt: PAPP-A

Referenční materiál:	LOT:	hodnota	Souprava, kat. č.:	viz SOPV
Kon. hl. 2 PC Mat.care	159 261	2250,00	Pracovník:	Jana Krystlová
			Používané jednotky:	mIU/l
Přístroj:	Roche Elecsys 2010	Datum verifikace:		28.10.11

Výsledky verifikace:

Opakovatelnost	
Průměr:	2255,20
CV (%):	1,051
SD:	23,693

Reprodukovatelnost	
Průměr:	2178,10
CV (%):	2,886
SD:	62,855

BIAS:	-71,9
BIAS (%):	-3,2

Dlouhodobá přesnost:

Elecsys 2010	16,88	%
--------------	-------	---

Nejistota systematické odchylky:

Elecsys 2010	0,65	%
--------------	------	---

Systematická odchylka:

Elecsys 2010	-3,20	%
--------------	-------	---

Odhad kombinované nejistoty:

Elecsys 2010	17,19	%
--------------	-------	---

Primární data:

Data ze série vzorků	1	2228
	2	2282
	3	2261
	4	2227
	5	2278

Data z denních kontrol	datum	2250,0
	18.9.11	2052
	19.9.11	2102
	20.9.11	2160
	21.9.11	2244
	22.9.11	2191
	23.9.11	2270
	24.9.11	2179
	25.9.11	2189
	26.9.11	2240
27.9.11	2154	

Závěr: Metoda je vhodná pro použití v in vitro diagnostice dle příslušného SOP.

Zpracoval: dne 19.10.2011 Mgr. Jan Pánek



b) verifikační protokol metody free beta-hCG

Verifikační protokol

Analyt: free beta-hCG

Referenční materiál:	LOT:	hodnota	Souprava, kat. č.:	viz SOPV
Kon. hl. 2 PC Mat.care	159 261	47,20	Pracovník:	Jana Krystlová
			Používané jednotky:	IU/l
Přístroj:	Roche Elecsys 2010		Datum verifikace:	28.10.11

Výsledky verifikace:

Opakovatelnost	
Průměr:	47,38
CV (%):	1,658
SD:	0,786

Reprodukovatelnost	
Průměr:	48,01
CV (%):	4,587
SD:	2,202

BIAS:	0,8
BIAS (%):	1,7

Dlouhodobá přesnost:

Elecsys 2010	3,29	%
--------------	------	---

Nejistota systematické odchylky:

Elecsys 2010	1,03	%
--------------	------	---

Systematická odchylka:

Elecsys 2010	1,72	%
--------------	------	---

Odhad kombinované nejistoty:

Elecsys 2010	3,85	%
--------------	------	---

Primární data:

Data ze série vzorků	1	46,07
	2	48,18
	3	48,14
	4	47,51
	5	47,01

Data z denních kontrol	datum	47,2
	18.9.11	45,59
	19.9.11	46,38
	20.9.11	46,08
	21.9.11	50,48
	22.9.11	50,14
	23.9.11	50,82
	24.9.11	50,87
	25.9.11	46,25
	26.9.11	48,02
27.9.11	45,47	

Závěr: Metoda je vhodná pro použití v in vitro diagnostice dle příslušného SOP.

Zpracoval: dne 19.10.2011 Mgr. Jan Pánek



c) verifikační protokol metody AFP

Verifikační protokol

Analyt: AFP

Referenční materiál:	LOT:	hodnota	Souprava, kat. č.:	viz SOPV
Kon. hl 1 PC Universal	157 887	61,47	Pracovník:	Jana Krystlová
			Používané jednotky:	ng/ml
Přístroj:	Roche Elecsys 2010	Datum verifikace:		28.10.11

Výsledky verifikace:

Opakovatelnost	
Průměr:	61,13
CV (%):	0,221
SD:	0,135

Reprodukovatelnost	
Průměr:	57,86
CV (%):	3,395
SD:	1,964

BIAS:	-3,6
BIAS (%):	-5,9

Dlouhodobá přesnost:

Elecsys 2010	2,40	%
--------------	------	---

Nejistota systematické odchylky:

Elecsys 2010	0,76	%
--------------	------	---

Systematická odchylka:

Elecsys 2010	-5,88	%
--------------	-------	---

Odhad kombinované nejistoty:

Elecsys 2010	6,39	%
--------------	------	---

Primární data:

Data ze série vzorků	1	60,95
	2	61,33
	3	61,02
	4	61,12
	5	61,21

Data z denních kontrol	datum	61,47
	18.9.2011	56,24
	19.9.2011	55,98
	20.9.2011	54,70
	21.9.2011	59,44
	22.9.2011	59,13
	23.9.2011	57,20
	24.9.2011	58,12
	25.9.2011	61,08
	26.9.2011	56,47
	27.9.2011	60,21

Závěr: Metoda je vhodná pro použití v in vitro diagnostice dle příslušného SOP.

Zpracoval: dne 19.10.2011 Mgr. Jan Pánek



d) verifikační protokol metody hCG

Verifikační protokol

Analyt: hCG

Referenční materiál:	LOT:	hodnota	Souprava, kat. č.:	viz SOPV
Kon. hl 1 PC Universal	157 887	5,42	Pracovník:	Jana Krystlová
			Používané jednotky:	IU/l
Přístroj:	Roche Elecsys 2010	Datum verifikace:		28.10.11

Výsledky verifikace:

Opakovatelnost	
Průměr:	4,88
CV (%):	3,392
SD:	0,166

Reprodukovatelnost	
Průměr:	5,12
CV (%):	4,592
SD:	0,235

BIAS:	-0,3
BIAS (%):	-5,5

Dlouhodobá přesnost:

Elecsys 2010	3,25	%
--------------	------	---

Nejistota systematické odchylky:

Elecsys 2010	1,03	%
--------------	------	---

Systematická odchylka:

Elecsys 2010	-5,46	%
--------------	-------	---

Odhad kombinované nejistoty:

Elecsys 2010	6,44	%
--------------	------	---

Primární data:

Data ze série vzorků:	1	5,14
	2	4,62
	3	4,85
	4	4,91
	5	4,88

Data z denních kontrol:	datum	5,4
	18.9.11	5,33
	19.9.11	5,11
	20.9.11	5,01
	21.9.11	5,03
	22.9.11	4,86
	23.9.11	4,85
	24.9.11	5,60
	25.9.11	4,92
	26.9.11	5,40
	27.9.11	5,13

Závěr: Metoda je vhodná pro použití v in vitro diagnostice dle příslušného SOP.

Zpracoval: dne 19.10.2011 Mgr. Jan Pánek



Zdroj: OKB Privamed a.s. v Plzni

Obr.7 Kontrolní vzorky v programu Alpha

a) screening v I. trimestru – negativní

Screeningové centrum-Genetika Plzeň, s.r.o.
Doc.MUDr.F.Lošan, CSc., MUDr.P.Lošan
Nepomucká 159/A, 32600 Plzeň, tel.:377241529

SKRÍNING DOWNOVY CHOROBY

Datum zprávy 21 5 12

Příjmení : VZOREK
Jméno : B1
Rc 2 :
Datum narození : 05.02.79
PM : Bez zprávy
Termín : 19.11.12
Datum odběru : 14.05.12
Číslo vyšetření :

KLINICKÉ ÚDAJE A VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ

ICZ :
Pojistovna :
Věk matky v termínu porodu : 33 let
UZ vyšetření(CRL) : 57 mm dne 10.05.12
Délka těhotenství při vyšetření : 13 týden 0 den (dle CRL)
Váha : 66 kg
Hodnota Fβ hCG Itrim : 31,9 iu/L : 1,09 MoM
Hodnota PAPP-A : 1,8 miu/mL : 0,46 MoM

INTERPRETACE

Výsledek : Skríníng negativní
Riziko M.Down : 1 z 550 (v termínu)
Poznámky : Riziko M.Down očekávané pouze vzhledem k věku matky je (1 z 540)
Poznámky : Pro časné těhotenství nehodnoceno riziko NTD

b) screening ve I. trimestru- pozitivní

Screeningové centrum-Genetika Plzeň, s.r.o.
Doc.MUDr.F.Lošan, CSc., MUDr.P.Lošan
Nepomucká 159/A, 32600 Plzeň, tel.:377241529

SKRÍNING DOWNOVY CHOROBY

Datum zprávy 21 5 12

Příjmení : VZOREK
Jméno : A1
Rc 2 :
Datum narození : 15.01.79
PM : Bez zprávy
Termín : 21.11.12
Datum odběru : 14.05.12
Číslo vyšetření :


KLINICKÉ ÚDAJE A VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ

ICZ :
Pojistovna :
Věk matky v termínu porodu : 33 let
UZ vyšetření(CRL) : 56 mm dne 11.05.12
Délka těhotenství při vyšetření : 12 týden 5 den (dle CRL)
Váha : 67 kg
Hodnota Fβ hCG 1trím : 48,6 iu/L : 1,58 MoM
Hodnota PAPP-A : 0,91 miu/mL : 0,26 MoM

INTERPRETACE

Výsledek : *****SKRÍNING POZITIVNÍ*****
Důvod : Zvýšené riziko M.Down
Riziko M.Down : 1 z 45 (v termínu)
Poznámky : Riziko M.Down očekávané pouze vzhledem k věku matky je (1 z 530)
Poznámky : Pro časně těhotenství nehodnoceno riziko NTD

Positivní výsledek skríníngu znamená zvýšené riziko postižení plodu Downovým syndromem. Většina plodu matek s pozitivním výsledkem skríníngu však tuto vadu nemá

 This is an Alpha report

c) screening ve II. trimestru - negativní

Screeningové centrum-Genetika Plzeň, s.r.o.
Doc.MUDr.F.Lošan, CSc., MUDr.P.Lošan
Nepomucká 159/A, 32600 Plzeň, tel.:377241529

SKRÍNING VAD NEURÁLNÍ TRUBICE A DOWNOVY CHOROBY Datum zprávy 21 5 12

Příjmení : VZOREK
Jméno : A2
Rc 2 :
Datum narození : 09.05.77
PM : Bez zprávy
Termín : 29.10.12
Datum odběru : 14.05.12
Číslo vyšetření :

KLINICKÉ ÚDAJE A VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ

ICZ :
Pojistovna :
Věk matky v termínu porodu : 35 let
UZ morfometrie : Není známo
Délka těhotenství při vyšetření : 16 týden 0 den (podle UZ)
Váha : 68 kg
Hodnota MS-AFP : 38,1 ng/mL ; 1,16 MoM
Hodnota Total hCG : 26,3 kiu/L ; 1,05 MoM

INTERPRETACE

Výsledek : Skrining negativní
Riziko M.Down : 1 z 2800 (v termínu)
Riziko NTD : 1 z 9400
Poznámky : Riziko M.Down očekávané pouze vzhledem k věku matky je (1 z 360)

d) screening ve II. trimestru- pozitivní

Screeningové centrum-Genetika Plzeň, s.r.o.
Doc.MUDr.F.Lošan, CSc., MUDr.P.Lošan
Nepomucká 159/A, 32600 Plzeň, tel.:377241529

SKRÍNING VAD NEURÁLNÍ TRUBICE A DOWNOVY CHOROBY Datum zprávy 21 5 12

Příjmení : VZOREK
Jméno : B2
Re 2 :
Datum narození : 11.05.77
PM : Bez zprávy
Termín : 26.10.12
Datum odběru : 14.05.12
Číslo vyšetření :

KLINICKÉ ÚDAJE A VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ

ICZ :
Pojistovna :
Věk matky v termínu porodu : 35 let
UZ morfometrie : Není známo
Délka těhotenství při vyšetření : 16 týden 3 den (podle UZ)
Váha : 70 kg
Hodnota MS-AFP : 32,9 ng/mL ; 0,96 MoM
Hodnota Total hCG : 41,4 kiu/L ; 1,79 MoM

INTERPRETACE

Výsledek : Skríníng ~~negativní~~ *pozit.*
Riziko M.Down : 1 z 290 (v termínu)
Riziko NTD : 1 z 12000
Poznámky : Riziko M.Down očekávané pouze vzhledem k věku matky je (1 z 360)

 This is an Alpha report

Zdroj : Genetika Plzeň s.r.o.

