

---

# Biochemický screening VVV

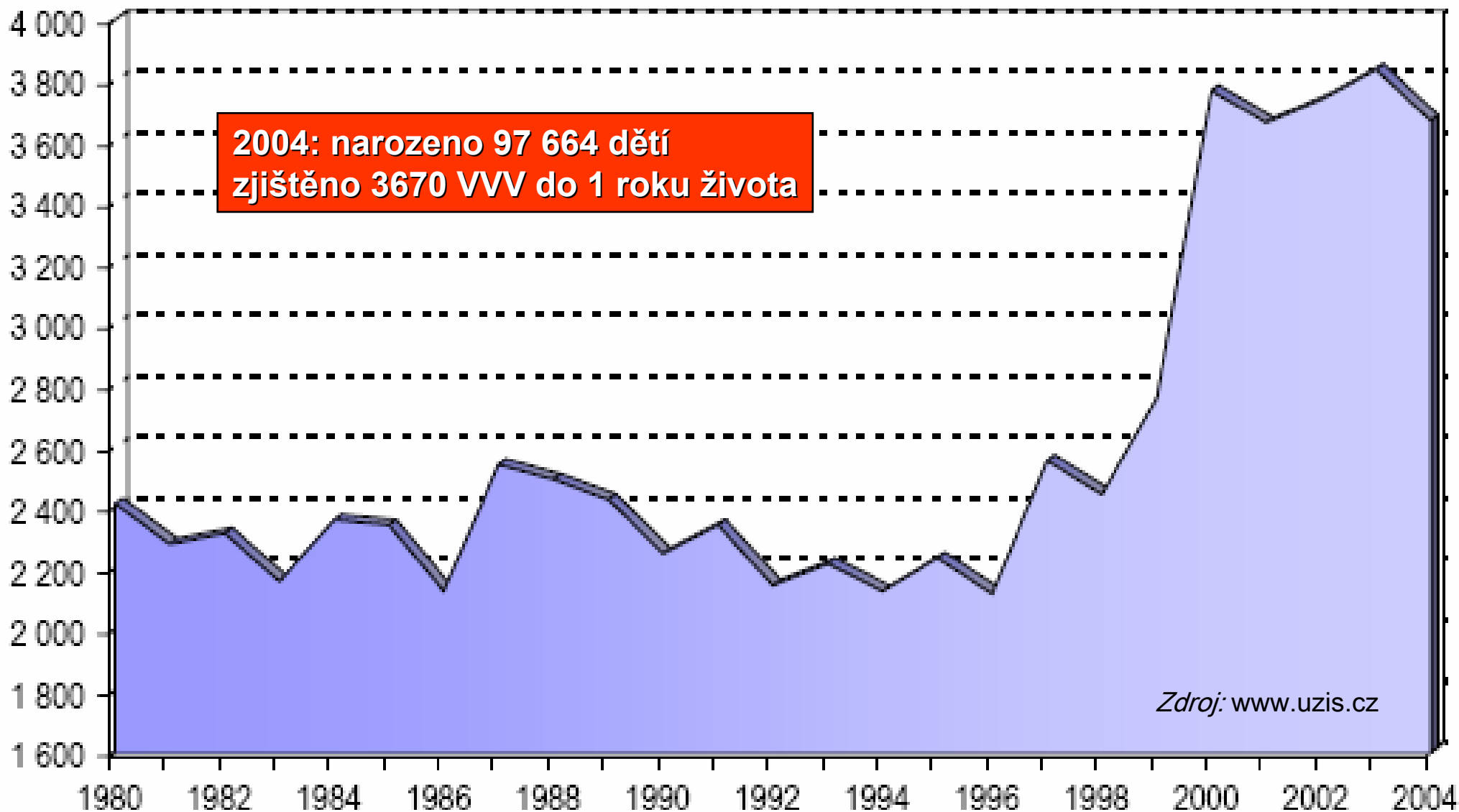


***Olga Bálková***  
***Roche s.r.o., Diagnostics Division***

# Sledování vrozených vývojových vad (VVV) v ČR

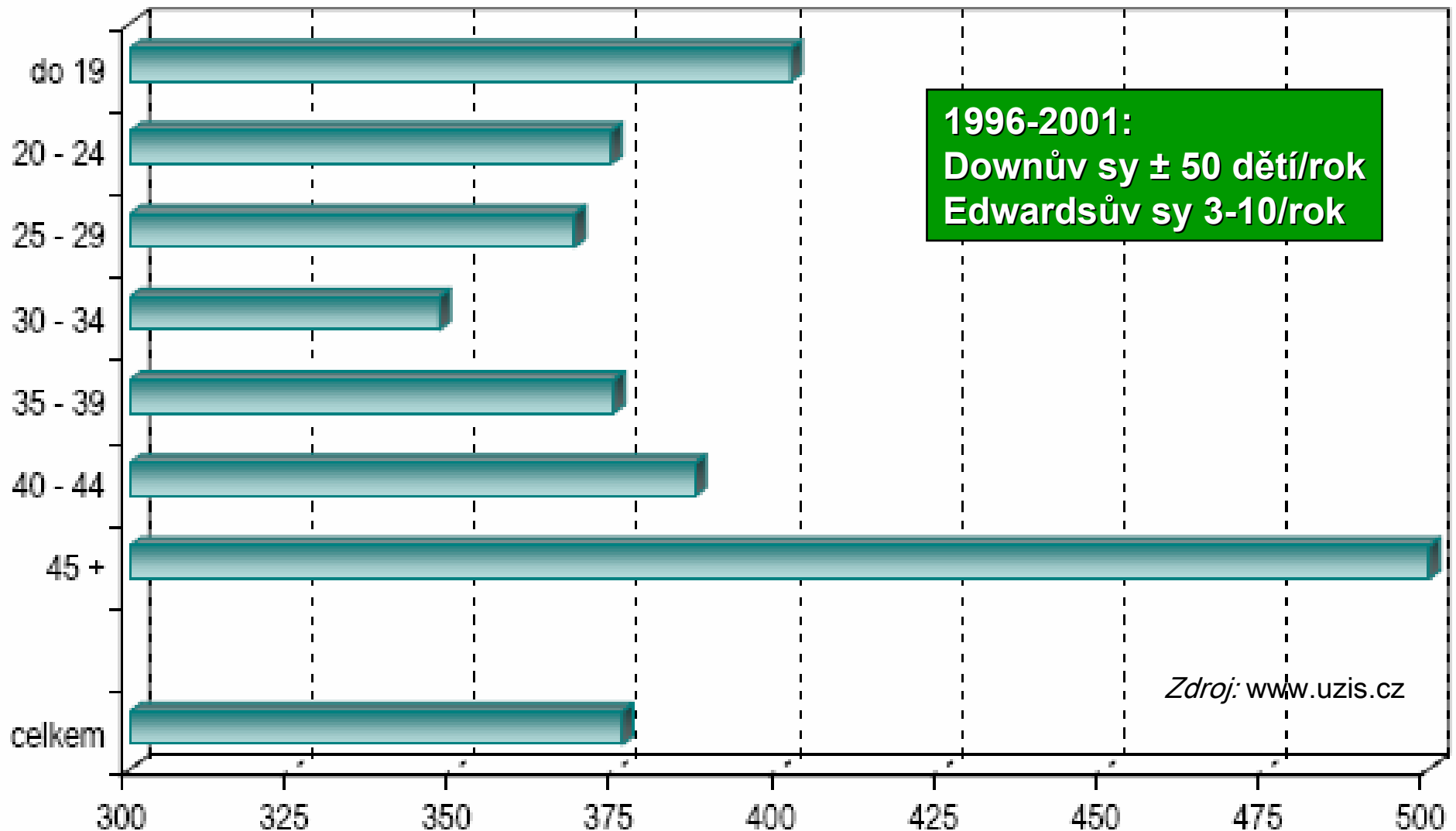
- V **ČSSR**: povinné hlášení VVV od r. 1965
  - od 1.1.1994 – sledování všech VVV, které se objeví do 15. roku a u mrtvě narozených dětí
  - od 1.1.1996 – sledování i prenatálně dg. VVV
- VVV sledovány:
  - u plodů, kdy se vrozená vada zjistila při prenatální diagnostice, a u samovolných potratů nad 500 gramů,
  - u dětí do dokončeného 15. roku života,
  - u mrtvě narozených dětí.
- Některé VVV se hlásí do mezinárodního registru International Clearing House for Birth Effects Surveillance and Research.

# Vývoj počtu živě narozených s VVV



# Živě narození s VVV dle věku maminky

na 10 000 živě narozených



# Prenatální diagnostika

## Neinvazivní diagnostika

vyšetření gravidních žen  
ultrazvuk (SONO)  
biochemický screening

## Invazivní metody

odběr plodové vody  
(amniocentéza, 15.-19.t.),  
choriových klků (CVS, 11.-14.t.),  
krve z pupečníku (kordocentéza, po 18.t.)

Pozn.: odběr plodové vody + kultivace buněk v ČSSR poprvé 1970,  
Downův sy poprvé dg. prenatálně 1971

# Doporučení ČGPS

## *Nepravidelná vyšetření*

### 16. týden:

- stanovení krevní skupiny a Rh faktoru
- vyšetření titru erytrocytárních protilátek
- krevní obraz
- sérologické vyšetření PL proti syfilis
- [biochemický screening VVV ve II. trimestru](#)
- vyšetření močového sedimentu

### 18.-20. týden:

- první SONO screening plodu

### 24.-28. týden:

- screening poruch glukózové tolerance

### 30.-32. týden:

- vyšetření titru erytrocytárních PL u žen Rh negativních a s krevní skupinou 0 (nula)
- krevní obraz
- sérologické vyšetření HBsAg a HIV
- druhý SONO screening plodu

### 36.-37. týden:

- detekce streptokoků skupiny B v pochvě

### 36., 37., 38., 39. a 40. týden:

- CTG non-stress test

Česká společnost klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP)  
Česká společnost nukleární medicíny (ČSNM ČLS JEP) -sekce imunoanalytických metod  
Česká gynekologicko-porodnická společnost (ČGPS ČLS JEP)  
Společnost lékařské genetiky ČLS JEP (SLG ČLS JEP)  
Referenční laboratoř MZ ČR pro klinickou biochemii

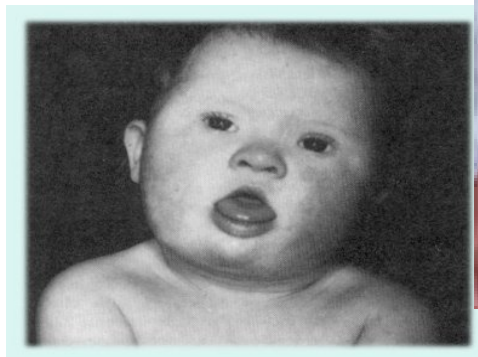
Novelizované doporučení z 8. 12. 2005 – finální verze schválená 19.4.2006

## **Doporučení o laboratorním screeningu vrozených vývojových vad v prvním a druhém trimestru těhotenství**

# Biochemický a SONO screening VVV

## I. trimestr

- Stanovení specifického těhotenského proteinu **PAPP-A** (pregnancy-associated plasma protein A)
- Stanovení volné  $\beta$ -podjednotky hCG (**free  $\beta$ -hCG**)
- SONO vyšetření plodu: nuchální translucence (NT), přítomnost nosní kůstky



## II. trimestr

- hCG
- AFP } **double test**
- (nekonjugovaný estriol) } **triple test**
- SONO vyšetření plodu k přesnému určení gestačního stáří
- Vyšetření uE3 + SP1 zásadním způsobem nezlepšují přesnost screeningu.



# Integrovaný test

## I. trimestr

- stanovení PAPP-A (9.-11. t.)
- SONO určení délky těhotenství  
změření NT (11.-13. t.)
- předběžné hodnocení ošetřujícím  
lékařem

## II. trimestr (15.-18. t.)

- stanovení AFP
- stanovení hCG
- kombinované hodnocení spolu  
s výsledky z I. trimestru

Věkové riziko matky se pomocí speciálních počítačových programů upravuje a určuje se individuální riziko.

Za pozitivní screening se považuje riziko **1:300 a vyšší**. Toto zjišťujeme u 5-7 % těhotných žen. U 1 z 50 takto zachycených žen je amniocentézou zachycena aneuploidie.

# Požadavky na laboratoře

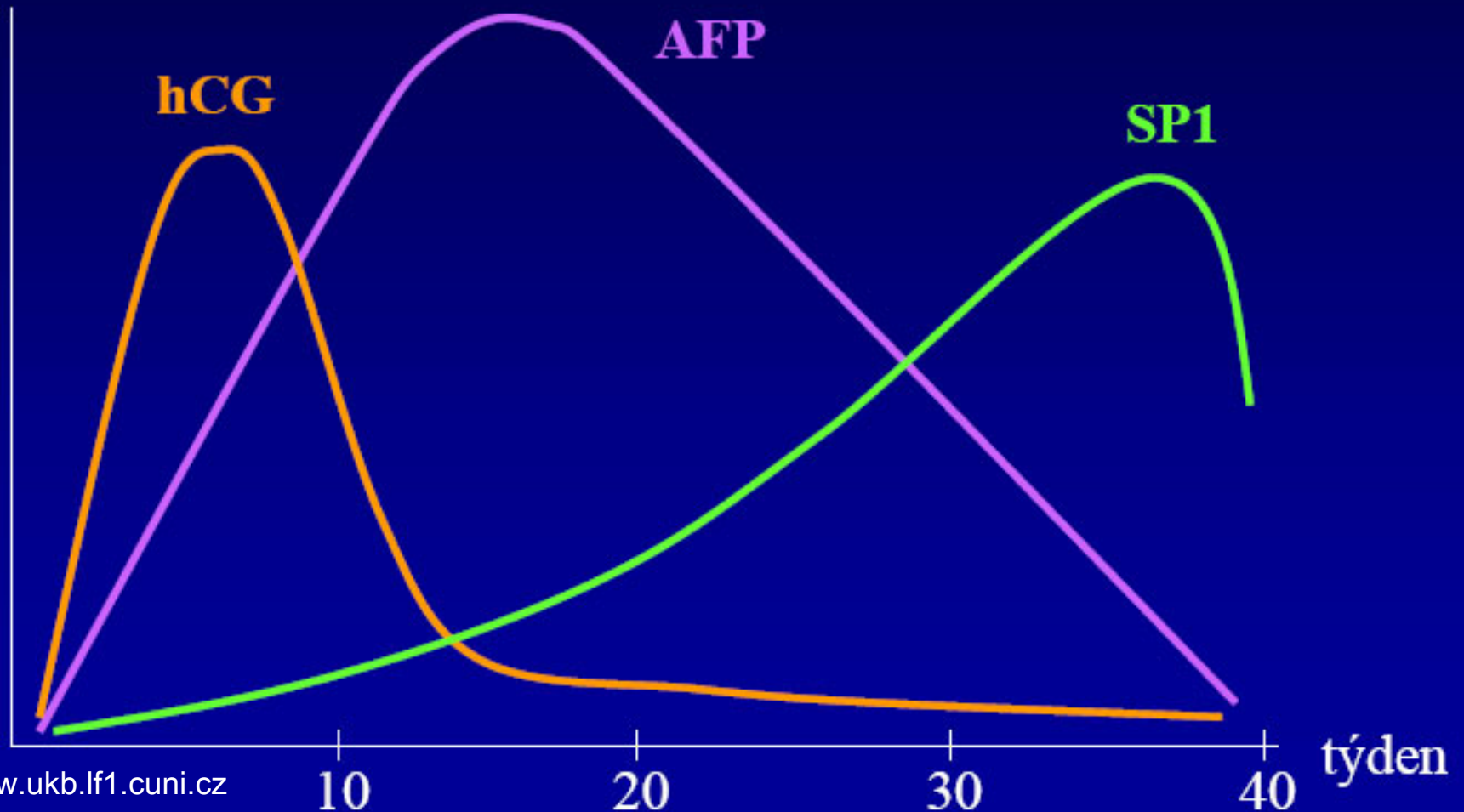
1. Podmínkou pro zařazení laboratoře do sítě laboratoří provádějících laboratorní screening vrozených vývojových vad (VVV) je doložitelné provádění minimálně 1 000 screeningových vyšetření ročně, což platí jak pro první I., tak i pro II. trimestr, aby byly spolehlivě určeny mediány stanovovaných analytů pro daný gestační věk.
2. Laboratoř musí mít pracovníka odpovědného za provádění screeningu a za systém vnitřní i externí kontroly kvality (vysokoškolsky vzdělaný pracovník se specializovanou způsobilostí v klinickém laboratorním oboru).
3. Laboratoř používá účinný systém vnitřní kontroly kvality, zúčastňuje se externího hodnocení kvality nejméně ve 2 kontrolních cyklech ročně a vlastní platné příslušné certifikáty/osvědčení.
4. Laboratoř má vypracovaný postup pro odběr, transport a skladování vzorků, které provádí v souladu s požadavky na preanalytickou fázi.
5. Laboratoř musí spolupracovat s ošetřujícím gynekologem a genetickým pracovištěm, které provádí konečné vyhodnocení screeningu. Výsledky stanovení jednotlivých analytů musí být laboratoří vydány nejpozději do tří pracovních dnů od přijetí vzorku. Výsledek výpočtu rizika VVV je vydáván nejen v absolutní hodnotě, ale i v násobcích mediánu pro daný gestační věk. Výsledek screeningu je předáván požadujícímu gynekologickému pracovišti, které je odpovědné za další postup.

# Stanovení markerů

- Vyjadřování **absolutní koncentrace** v mateřském séru
- Vyjadřování koncentrace v **MoM** (multiples of median, násobky mediánu)
  - Naměřené výsledky musí být před přepočtem na MoM vždy korigovány na hmotnost matky (zředňovací prostor)!
  - Nutno používat **stejnou diagnostickou soupravu**, rozdíly při stanovení různými soupravami až 100%!!!
  - Významný **vliv nepřesností stanovení na výsledek biochemického screeningu** (u imunochemických metod běžně intraassay do 10 %)

# Produkce onkofetálních antigenů fetoplacentární jednotkou v průběhu těhotenství

produkované  
množství  
OF Ag



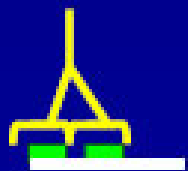
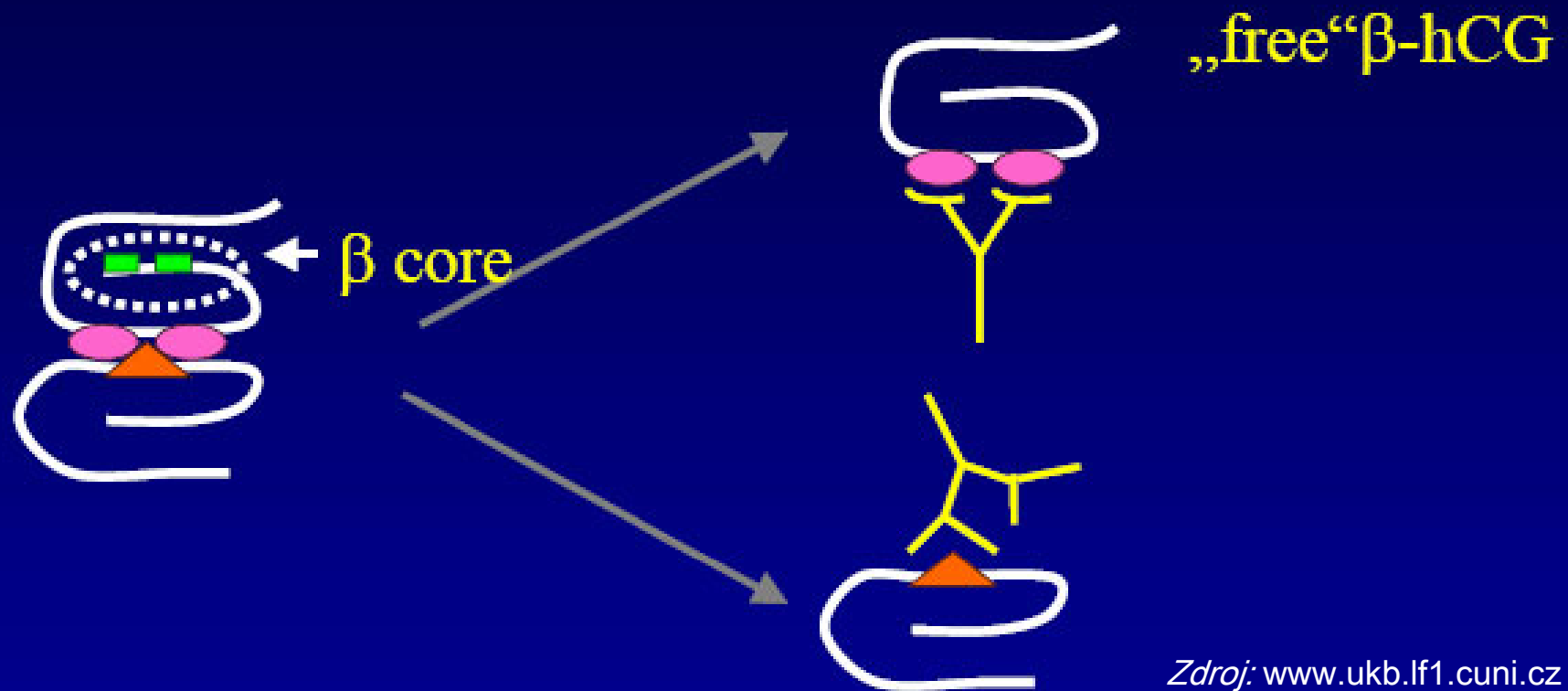
# Lidský choriový gonadotropin (*hCG*)

- Glykoprotein produkovaný trofoblastem placenty, udržuje funkci žlutého tělíska (produkce steroidních hormonů)
- m.w. 36 700 D,  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotka
  - $\alpha$ -podjednotka (92 AMK) jako u LH, FSH a TSH
  - $\beta$ -podjednotka (145 AMK) je podobná LH, liší se ve 24 AMK
- Fyziologický výskyt: těhotenství (*testy na graviditu*), vyšší hodnoty u vícečetných těhotenství
- Patologický výskyt: nádory vycházející z choriové tkáně – trofoblastická nemoc (chorioCa a mola), germinální nádory testes a ovarií, vzácněji u jiných lokalizací
- Screening Downova sy ve II. trimestru:  
*hodnoty cca 2,04x vyšší*, než u nepostižených těhotenství
- Zvýšení hladin ve III. trimestru:
  - růstová retardace plodu
  - gestóza
  - předčasný porod

# Nejčastěji stanovované formy hCG

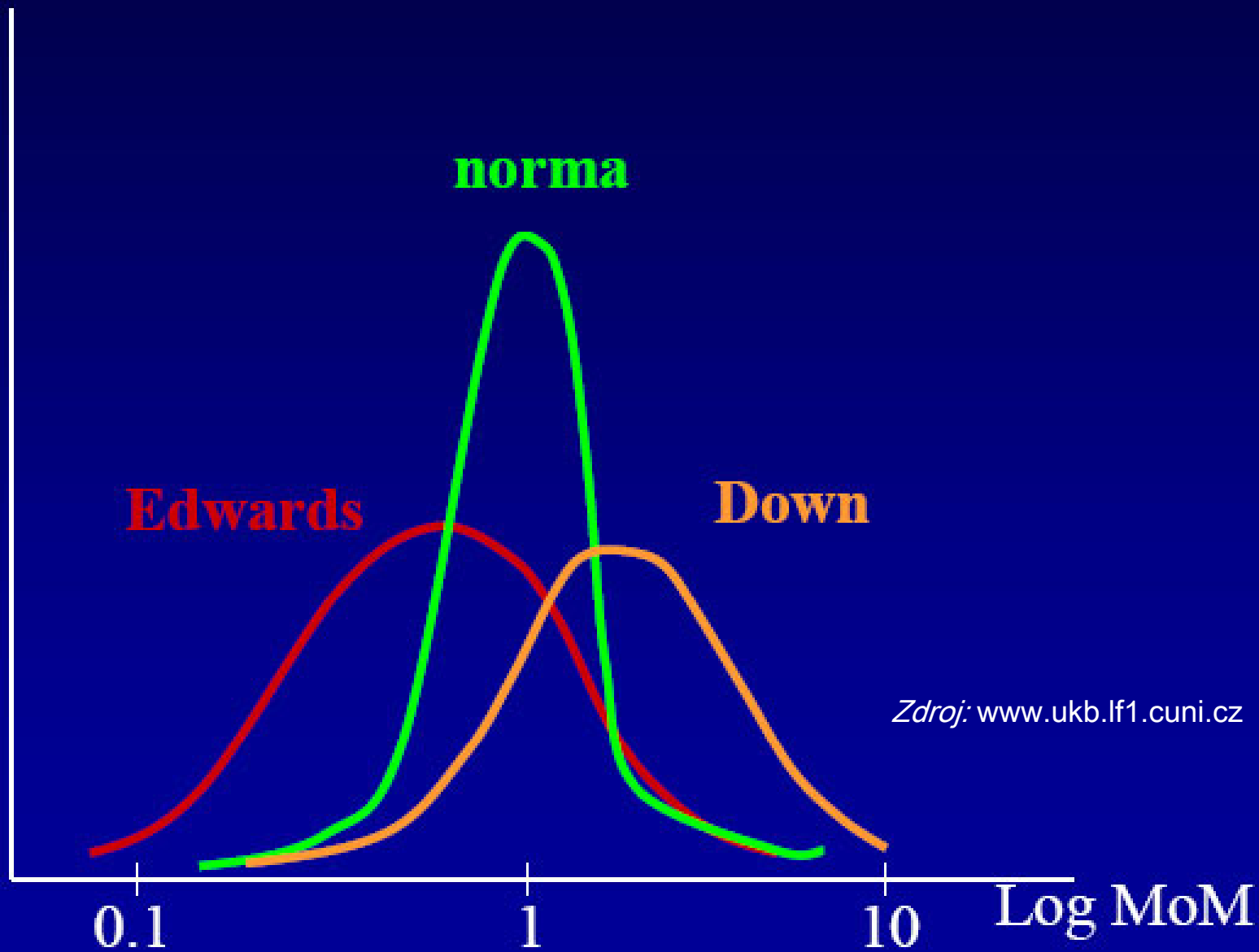
- „Total“ hCG: - nejčastěji pomocí polyklonálních antisér  
- stačí pro dg. těhotenství
- $\beta$ -hCG: „specifické“ hCG (nádorová dg.)
- „free“ $\beta$ -hCG: náročné z hlediska preanalytiky  
(rozpad hCG ve vzorku zvláště při vyšší teplotě a zvýšení „free“ $\beta$ -hCG )
- $\beta$ -core hCG: vhodný pro stanovení v moči, není vhodný pro konec I. trimestru, kdy je produkce hCG tak vysoká, že se nestačí odbourávat na  $\beta$ -core hCG a vylučuje se jen částečně naštěpená molekula hCG
- Hyperglykosylované („kyselé“) hCG: charakteristické pro nezralou placentu na zač. těhotenství a pro chorioCa. Dle některých studií ve zvýšené míře v moči žen s plodem postiženým Downovým sy.

# Lidský choriový gonadotropin (hCG)



$\beta$  core – vylučuje se močí, je velmi stabilní, lze jej využít pro screening v II. trimestru

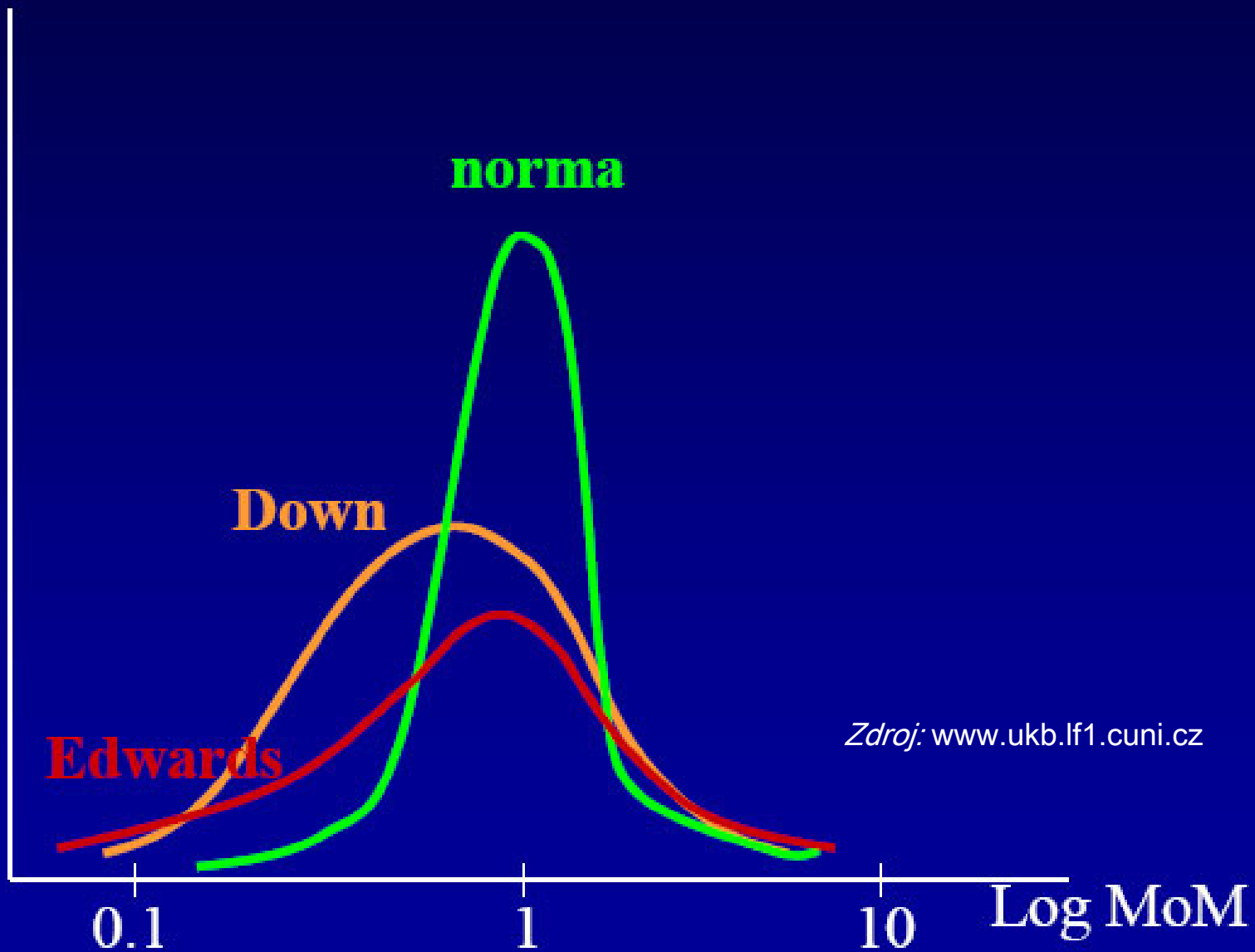
# hCG



# Alfa-1-fetoprotein (AFP)

- Glykoprotein, m.w. 64 600 D, značná část sekvenční homologie s albuminem („fetální albumin“)
- **Funkce:** vazba estrogenů, transport mastných kyselin, imunosupresivní účinky
- **Fyziologická produkce:** žloutkový váček a fetální játra. Vylučován ledvinami plodu do plodové vody, odtud resorbován do mateřského krevního oběhu. Na počátku II. trimestru gravidity – hlavní sérový protein plodu, pak až do porodu postupně nahrazován albuminem.
- **Stanovení:** sérum, plodová voda  
V mateřském séru koncentrace stoupá od 10. do 32. týdne těhotenství (>200 µg/l), pak postupně klesá. Na konci těhotenství hodnoty cca 70 µg/l.
- **Patologická produkce:** nádory jater, varlat a vaječníků, méně často GIT a jiných lokalizací

# AFP



# Změny koncentrací AFP

- **Zvýšené hladiny:**

- otevřené defekty neurální trubice
- defekty stěny břišní
- obstrukce močových cest
- ezofageální a duodenální atrézie
- hydrocefalus
- hemangiom pupečníku
- omfalokéla
- nekróza jater fétu
- sakrokokcygeální teratom
- Turnerův sy
- Fallotova tetralogie
- osteogenesis imperfecta
- trisomie 13. chromosomu

- **Snížené hladiny:**

- Downův sy
- Edwardsův sy
- nemoci trofoblastu
- odumřelý plod
- spontánní potrat
- mola

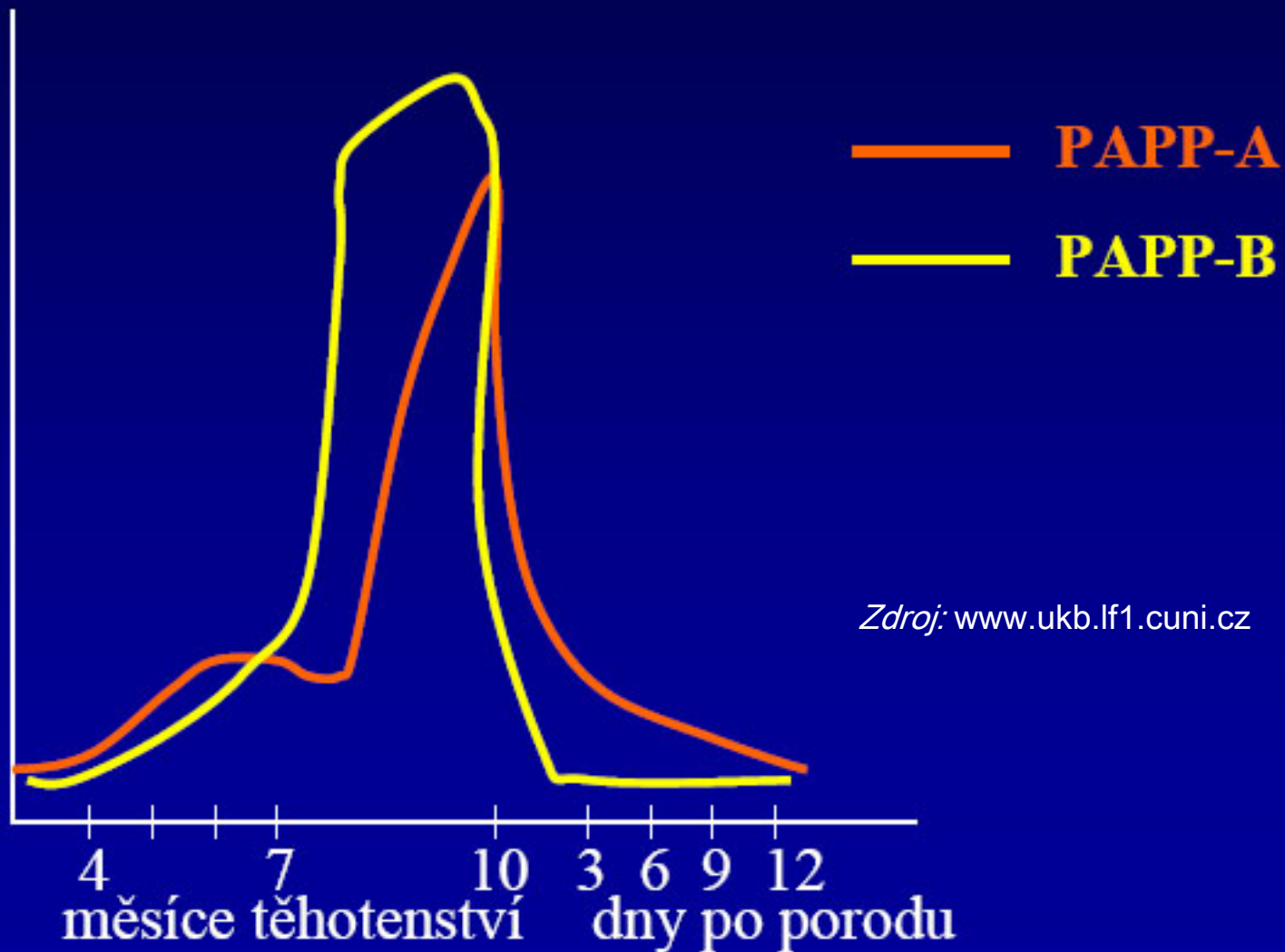
# Pregnancy-associated plasma proteins (*PAPPs*)

- Popsány Linem et al. v r. 1973, detekovány pomocí králičího antiséra proti těhotenské plazmě z II. a III. trimestru (pool), které bylo vysyceno plazmou netěhotných žen, při imunoelktroforéze několik precipitačních linií, označeny A, B, C a D
- **PAPP-D:** totožný s hPL (lidský placentární laktogen, přesněji lidský choriový somatomotropin, hCS), jejich stanovení není imunochemickými metodami možné  
 Proteohormon tvořený trofoblastem  
 Koncentrace plynule v graviditě stoupají:  
 10. týden – 0,5 mg/l  
 26. týden – 3,5 mg/l  
 30.-38. týden – 8,5 mg/l  
 Náhlý pokles → porucha fetoplacentární jednotky
- **PAPP-B:** m.w. 1 000 000 D, maximální hodnoty na konci III. trimestru, poločas po porodu <1 den

# PAPP-A

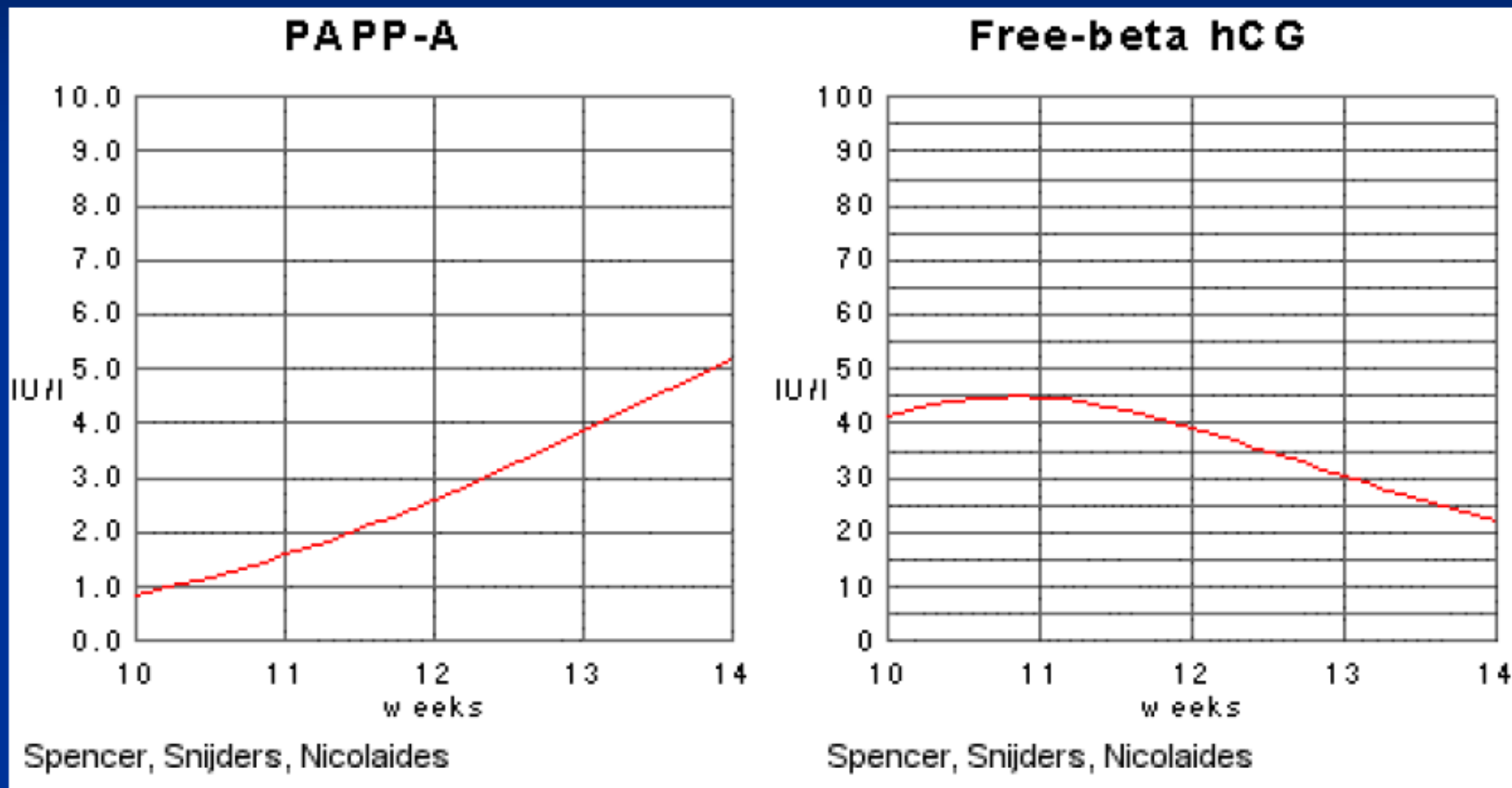
- Glykoprotein, m. w. 750 000 D, tvořen placentou, koncentrace se zvyšují během gravidity, maximum dosaženo při porodu (400 µg/l), biol. poločas po porodu 3-4 dny
- Metaloproteináza, štěpí IGFBP-4, 2 a 5 (insulin like growth factor binding protein), uvolněny jsou IGF, které hrají roli při regulaci lokálních proliferačních reakcí – reprodukční pochody, hojení ran, ateroskleróza
- Zjistitelný 21. den po koncepci v mateřském séru
- **Downův sy:** nízké koncentrace v I. trimestru MoM 0,38 (nezralost buněk placenty), ve II. trimestru nabývá norm. koncentrací
- Na konci těhotenství **zvýšen u preeklampsie** a snížen u hrozícího potratu
- Kombinované stanovení free-β-hCG + PAPP-A v I. trimestru (záchytnost Downova sy 63 %)
- SONO (nuchální projasnění) + snížené hodnoty PAPP-A = 90% zachycení Downova sy
- (Nový marker akutního koronárního syndromu)

# PAPP-A a PAPP-B v průběhu těhotenství a po porodu



# PAPP-A a free $\beta$ -hCG

Zdroj: [http://www1.lf1.cuni.cz/~dbezd/Data/moznosti\\_laboratore.pdf](http://www1.lf1.cuni.cz/~dbezd/Data/moznosti_laboratore.pdf)



Plod s DS bude mít v průměru 2.0 MoM  $\beta$ -hCG a 0.4 MoM PAPP-A

# Trofoblast-specifický $\beta$ -1-globulin

## *PAPP-C (SP1)*

- Heterogenní glykoprotein, má několik molekulárních variant, nejvíce zastoupená složka má m.w. 80-120 000 D, asi 30 % sacharidů.
- **Funkce:** zatím neznámá, má imunosupresivní vlastnosti, část. strukturální homologie s CEA
- **Fyziologický výskyt:** v těhotenství produkován placentou → do oběhu matky (podobně jako hCG), biol. poločas po porodu 1-2 dny  
hladina 18-44 mg/l v 15. týdnu, 74-220 mg/l ve 40. týdnu gravidity  
marker aktivity zárodečných tkání
- **Patologický výskyt:** mola hydatidosa, zárodečné nádory, v těhotenství zvýšení  
zvýšení u **Downova sy**, snížení u spont. abortu
- Navrhované využití k monitoringu funkce placenty a dg. EPH gestózy nenašlo praktické uplatnění.

# Estriol

- Tvorba: DHEA-sulfát z nadledvin plodu → hydroxylace ve fetálních játrech → přeměna v placentě na E3 → do krevního oběhu fétu → vyloučen ledvinami do plodové vody → částečně proniká do oběhu matky → v játrech konjugován konjugován s glukuronátem a vyloučen močí
- Koncentrace plynule stoupají s postupem gravidity:
  - na konci gravidity – produkce 50-150 mg E3/24 hod.
- Využití ve skríninku **Downova sy** (II. trimestr):  
triple-test: AFP + free- $\beta$ -hCG + E3  
hodnoty 0,73-0,75x MoM
- Patologicky nízké koncentrace – porucha fetoplacentární jednotky

# Screening Downova sy

## I. vs II. trimestr

<b>Marker</b>	<b>I. trimestr</b>	<b>II. trimestr</b>
<i>Free-<math>\beta</math>-hCG</i>	efektivní	efektivní
<i>Intaktní hCG</i>	neefektivní	efektivní
<i>AFP</i>	neefektivní	efektivní pro rozštěpy neurální trubice
<i>Nekonjugovaný estriol</i>	neefektivní	kontroverzní údaje
<i>PAPP-A</i>	efektivní	neefektivní
<i><math>\beta</math>-core-hCG v moči</i>	???	potenciálně efektivní

# Vyšetření plodové vody

- Hladina **AFP** 10-100x vyšší než v séru  
50-100 mg/l v 15. týdnu  
5-10 mg/l ve 24. týdnu gravidity
- **Acetylcholinesteráza**: marker defektu neurální trubice a gastroschisis
- **Bilirubinoidy**: při podezření na hemolytickou chorobu novorozence, vyšetření po 30. týdnu gravidity
  - norma absorbance při 450 nm: 0,00-0,20
  - hodnota 0,30-0,70 = těžké postižení plodu
  - ↑ 0,70 = smrt plodu
- **Kreatinin**: stanovení gestační zralosti plodu a jeho plicní zralosti
- **Celková bílkovina** (klesá s postupující zralostí plodu), < 1,8 g/l = signifikantní pro zralost plodu
- L/S index (poměr **lecitin/sfingomyelin**) > 2 (u diabetiček > 3) = známka zralosti plicní tkáně

# Nuchální translucence a nosní kůstka



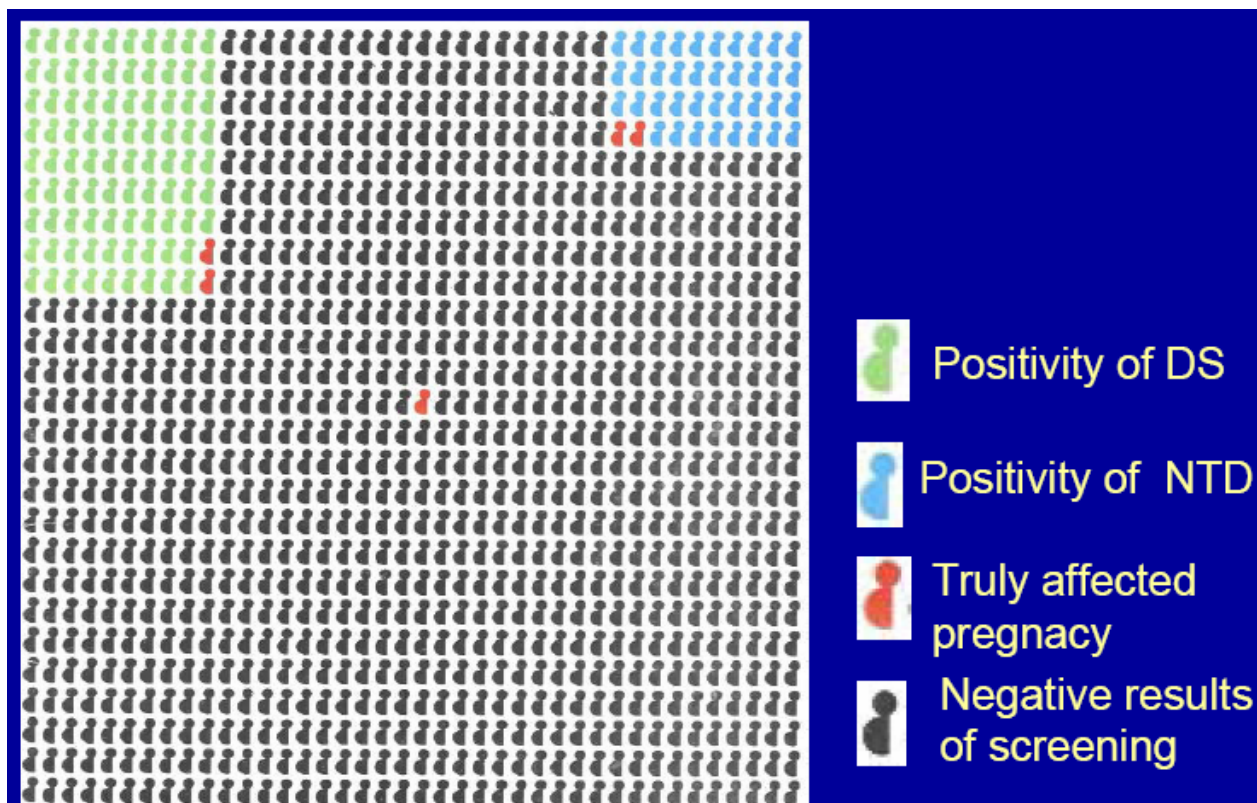
Porovnání procenta záchytu (DR, detection rate) u různých metod screeningu  
Downova sy při hodnotě falešně pozitivních záchytů 5 %  
(www.fetalmedicine.com)

Roche

Screeningová metoda	DR (%)
Věk matky (MA)	30
MA a vyšetření biochemie mateřského séra v 15.–18. týdnu	50–70
MA a vyšetření nuchální translucence (NT) plodu v 11.–13 <sup>+6</sup> . týdnu	70–80
MA a vyšetření NT plodu a volné $\beta$ -hCG a PAPP-A v mateřském séru v 11.–13 <sup>+6</sup> .týdnu	85–90
MA a vyšetření NT plodu a nosní kosti (NB) plodu v 11.–13 <sup>+6</sup> . týdnu	90
MA a vyšetření NT plodu a NB a volné $\beta$ -hCG a PAPP-A v mateřském séru v 11.–13 <sup>+6</sup> . týdnu	95

# Hodnocení rizika Downova sy

- Ženy s **vysokým** rizikem
  - věk >35 let
  - NT >2,0 mm
  - free-beta-hCG >2,5 MoM
  - PAPP-A <0,4 MoM
- Ženy s **nízkým** rizikem
  - věk <35 let
  - NT <2,0 mm
  - free-beta-hCG = 1,0 MoM
  - PAPP-A = 1,0 MoM



# Software stanovení rizika Downova sy





Identification Data 1 Data 2 Risk Estimate Report Result 1 Result 2

Markers with Gaussian distribution

Profile: (1) Combined First Trimester W

Marker	Value	U. of	Date / Biometry	MoM	T21 Risk	T18-13 R.
<input checked="" type="checkbox"/> Free beta hCG 1T W	22	mIU/ml	06/11/2006	0,6469	MoM 1 : 2991	1 : 13740
<input checked="" type="checkbox"/> PAPP-A W	1000	mIU/l	06/11/2006	0,3157	MoM 1 : 259	1 : 3217
<input checked="" type="checkbox"/> Nuchal Translucency	2,3	mm	55	1,5797	MoM 1 : 501	1 : 7772
<input type="checkbox"/>						
<input type="checkbox"/>						

Likelihood Ratio Trisomy 21 Markers

- Pielectasis
- Short femur
- Absent Nasal Bones
- Echogenic Cardiac Foci
- Echogenic Bowel
- Major Defect

Likelihood Ratio Trisomy 18 Markers

- Single Choroid Plexus Cyst
- Single Umbilical Artery
- Major Defect
- 
- 
- 

Trisomy 21 Maternal Age Risk  
1 : 907

Trisomy 21 Combined Risk  
1 : 497

Trisomy 18-13 Combined Risk  
1 : 5056

Aneuploidy Risk  
No

NTD Risk

**Compute**

Save New

Search

Clear

Report

Exit

# Stavy komplikující či znemožňující výpočet rizika VVV

- ChorioCa, mola hydatidosa: vysoké hCG a SP1, často snížení či zvýšení AFP (imituje m. Down či vícečetné těhotenství).
- Redukce počtu plodů při vícečetném těhotenství po IVF: často extrémně zvýšené AFP a hCG, hodnoty se rychle mění.
- Vícečetné těhotenství: často není zvýšení biochemických markerů symetrické, může imitovat defekty neurální trubice či Downův sy.
- Zamklý potrat či intrauterinní smrt plodu: zpočátku mohou být hodnoty bioch. markerů značně zvýšené, později klesají.
- Darované vejce: zpravidla od mladší dárkyně (komplikace při výpočtu – hmotnostní korekce na nositelku, věková na biologickou matku).

# Screening Downova sy ve světě

Stát	Biochemický screening		Amniocentéza
	I. trimestr PAPP-A, free- $\beta$ -hCG	II. trimestr AFP, hCG, E3	
Švýcarsko	ano	ano	n.a.
Velká Británie	ano	Mělo by se doporučovat všem těhotným bez ohledu na věk (čtyřnásobné testy, kombinované stanovení rizika)	ano, u rizikových skupin
Francie	n.a.	ano	ano , u žen > 38 let
Německo	ano	ano	ano, u rizikových skupin, žen > 35 let
Holandsko	ano	ano	ano, ženy > 36 let
Rakousko	n.a.	doporučováno těhotným > 35 let	n.a.
Kanada	ano	doporučení pro všechny těhotné předáno MZd	ano, ženy > 35 let
USA	ano	ano	ano nebo odběr choria, ženy > 35 let

# Skrínink Downova sy (zkušenosti ze SRN)

I. trimestr (8.-13. týden)	II. trimestr (≥ 14. týden)	Integrovaný skrínink (8.-20. týden)
Posouzení rizika chromozomálních abnormit	Posouzení rizika chromozomálních abnormit a spina bifida	Předpověď rizika podle výsledků biochem. vyš. a SONO v I. trimestru v kombinaci s biochem. vyš. 2. trimestru
SONO: nuchální projasnění		
Biochemické vyš. PAPP-A, free-β-hCG	Biochemické vyš. AFP, hCG, inhibin A, (E3)	Sérové markery PAPP-A, free-β-hCG AFP, inhibin A, (E3) nutné dva krevní odběry (11. týden + >15. týden)
Nelze určit defekty neurální trubice		Zjištění chromozomální abnormality nebo defekty neurální trubice
Záchytnost až 85-89 % falešně pozitivní 5 %	Záchytnost 65-70 % falešně pozitivní 5 %	<b>Záchytnost 95 % falešně pozitivní 1 %</b>