

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

(Novelizace doporučení schválená výše uvedenými odbornými společnostmi 10. 11. 2014)

J. Loucký², D. Springer¹, I. Šubrt³

¹ Česká společnost klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP)

² Česká společnost nukleární medicíny (ČSNM ČLS JEP) - sekce imunoanalytických metod

³ Společnost lékařské genetiky ČLS JEP (SLG ČLS JEP)

Referenční laboratoř MZ ČR pro klinickou biochemii

Systém provádění screeningu v 1. a 2. trimestru je dán dohodou mezi laboratoři, gynekology a genetiky.

I. Požadavky na laboratoře

1. Podmínkou pro zařazení laboratoře do sítě laboratoř provádějících laboratorní screening vrozených vývojových vad (VV) je doložitelné provádění minimálně 1 000 screeningových vyšetření ročně pro každý analyt, což platí pro biochemické markery 1. nebo 2. trimestru, aby byly spolehlivě určeny mediány pro daný gestační den.
2. Laboratoř musí mít pracovníka odpovědného za provádění laboratorních screeningových vyšetření a za systém jeho 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 pro každý z užívaných systémů screeningu 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. Výsledky stanovení jednotlivých analytů musí být laboratoři vydány nejpozději do tří pracovních dnů od přijetí vzorku. Výsledek je vydáván ve formě rizika vypočítaného validovaným softwarem (obvykle screening ve 2. trimestru) nebo v přímo v absolutních hodnotách naměřených biochemických markerů, přičemž riziko je vypočítáno genetickým nebo gynekologickým pracovištěm (obvykle screening v 1. trimestru). Výsledek je předáván požadujícímu gynekologickému pracovišti, které je odpovědné za další postup.
Přehled pracovišť provádějící laboratorní screening VV je veden při RL MZ ČR pro KB v Praze. Tyto informace jsou uvedeny na webové stránce - <http://www1.lf1.cuni.cz/screeningDS>
6. K hodnocení výsledků screeningu a informování o nových trendech se každý rok koná setkání odpovědných pracovníků všech laboratoř v rámci pravidelné odborné akce.

II. Sledované parametry

1. Biochemické markery screeningu VV

Doporučené laboratorní markery pro 1. trimestr – PAPP-A, volný β hCG (optimální odběr 9+1 až 11+3 týden těhotenství), PIGF (optimální odběr 11+0 až 13+6 týden těhotenství)

Doporučené laboratorní markery pro 2. trimestr – hCG (ev. volný β hCG), AFP, uE3, (optimální odběr 15. až 17. týden těhotenství)

Požadavky na preanalytické i analytické parametry metod, stejně jako na verifikaci, výpočty nejistot a externí kontrolu kvality jsou uvedeny v příloze č. 1.

2. Ultrazukové markery

Pro provádění screeningu v 1. trimestru těhotenství je nutné změření NT (nuchální translucence) dle metodiky Fetal Medicine Foundation (FMF) – London. Vyšetření může provádět sonografista po absolvování příslušného školení s vydáním osvědčení k tomuto vyšetření ve spolupráci s FMF Londýn. Toto osvědčení je potřeba pravidelně obnovovat, aby byla zajištěna dlouhodobá kvalita měřených parametrů.

Pro spolehlivé stanovení gestačního stáří je nutné ultrazukové vyšetření plodu. Referenční měření pro určení gestačního stáří je ultrazukové měření CRL v 11+0 – 13+6 týdnu gravidity.

Možnost vyšetření dalších UZ markerů trizomie 21 – nosní kosti, trikuspidální regurgitace, průtoku ductus venosus (ev. dalších) během UZ vyšetření na stanovení NT a morfologie plodu – tato varianta má vyšší DR při stejné, nebo nižší FPR. Certifikace a pravidelný audit pro obnovení licence je prováděn pro každý marker (NT, NB, TR, DV) zvlášť. Sonografista je ve screeningu oprávněn použít pouze ty markery, pro něž má platnou licenci.

III. Vydávání výsledků - výpočet rizika

Výpočet rizika vrozené vývojové vady musí být prováděn pomocí spolehlivého validovaného počítačového programu, který upozorňuje na zvýšené riziko

nejdůležitějších aneuploidií – trizomie 21. chromozomu (Downův syndrom), 18. chromozomu (Edwardsův syndrom) a 13. chromozomu (Patauův syndrom). Ve 2. trimestru na defekt neurální trubice (NTD).

IV. Možnosti provádění screeningu Downova syndromu

1. Sekvenční varianta integrovaného testu

Sekvenční varianta integrovaného testu vychází z teoretického modelu integrovaného testu, který má nejvyšší výtěžnost, ale v praxi se nepoužívá.

10+0 až 11+3: PAPP-A, resp. volný β hCG, ev. PIGF
11+3 až 13+6: měření NT sonografistou certifikovaným a pravidelně auditovaným u FMF Londýn

Předběžné vyhodnocení testu, vysoce pozitivní screening (obvykle riziko vyšší než 1:30) řešit okamžitě.

Ostatní těhotné ženy pokračují do 2. trimestru
15+0 až 20+0: AFP, hCG, uE3

Společné vyhodnocení po dokončení všech vyšetření.

V místech, kde není možné nabídnout spolehlivé měření NT je doporučován sérum **integrovaný test**, který vyhodnocuje pouze biochemické markery stanovené v krvi v obou trimestrech.

Oddělené vyhodnocování screeningu v 1. a 2. trimestru není doporučováno a je považováno za postup non lege artis!

2. Kombinovaný test

10+0 až 13+6: PAPP-A, volný β HCG, ev. PIGF
11+3 až 13+6: změření NT sonografistou certifikovaným a pravidelně auditovaným u FMF Londýn

Výtěžnost tohoto testu je vyšší při odběru biochemických markerů v 10. – 11. týdnu než při odběru ve 13. týdnu.

3. Biochemický screening v 2. trimestru – (triple nebo double test)

15+0 – 20+0: AFP, hCG, resp. uE3

Samostatně prováděný je vhodný pro ženy, které se dostaví pozdě na vyšetření v 1. trimestru, nebo při později zjištěné graviditě.

Falešná pozitivita a výtěžnost

	Falešná pozitivita při 85 % výtěžnosti	Výtěžnost při 5 % falešné pozitivitě
Integrovaný/ sekvenční test	0,8 - 1,2 %	94%
Sérum integrovaný test	2,7 - 5,2 %	85%
Kombinovaný test	3,8 - 6,8 %	85%
Triple nebo double test	9,3 - 14 %	69%

Rozmezí u FP závisí na týdnu těhotenství, ve kterém je test prováděn

V. Neinvazivní prenatální testování (NIPT)

Neinvazivní prenatální testování (NIPT) je novou, moderní technikou využívající masivní paralelní, nebo cílené sekvenování volné DNA (cfDNA) v krvi matky pro přesnou detekci chromozomálních vad plodu. Základním rozdílem z pohledu získávané informace je skutečnost, že NIPT vyhodnocuje přímo genetickou výbavu plodu, kdežto standardní screening pro hodnocení využívá surogátních parametrů asociovaných s hledaným onemocněním. Tento nový způsob testování chromozomálních vad plodu byl zaveden do praxe roku 2011. Zavedením NIPT došlo k výraznému zlepšení parametrů screeningu u těhotné populace. NIPT přináší těhotným ženám velmi přesné informace v brzkém stádiu těhotenství, ale v současné době jej stále nemůžeme považovat za diagnostickou metodu. NIPT nabízí jednoduchost provedení a vysokou přesnost bez obavy z invazivního zákroku. Jednotlivé neinvazivní testy se od sebe mohou odlišovat způsobem vyjádření výsledku, přesností, spektrem vyšetřovaných onemocnění a možnostmi použití.

1. Vlastnosti mimobuněčné DNA (cfDNA) v materní cirkulaci

V plazmě matky lze identifikovat jak mateřskou mimobuněčnou DNA, která pochází z bílých krvinek nebo jiných mateřských tkání, tak mimobuněčnou DNA fetálního původu (cffDNA), která pochází z placenty. Mimobuněčná DNA je tvořena relativně malými fragmenty (150-200 bp), které reprezentují kompletní genetickou informaci. Fetální DNA tvoří 4 – 25 % z celkové mimobuněčné DNA (průměrně ~10 %).

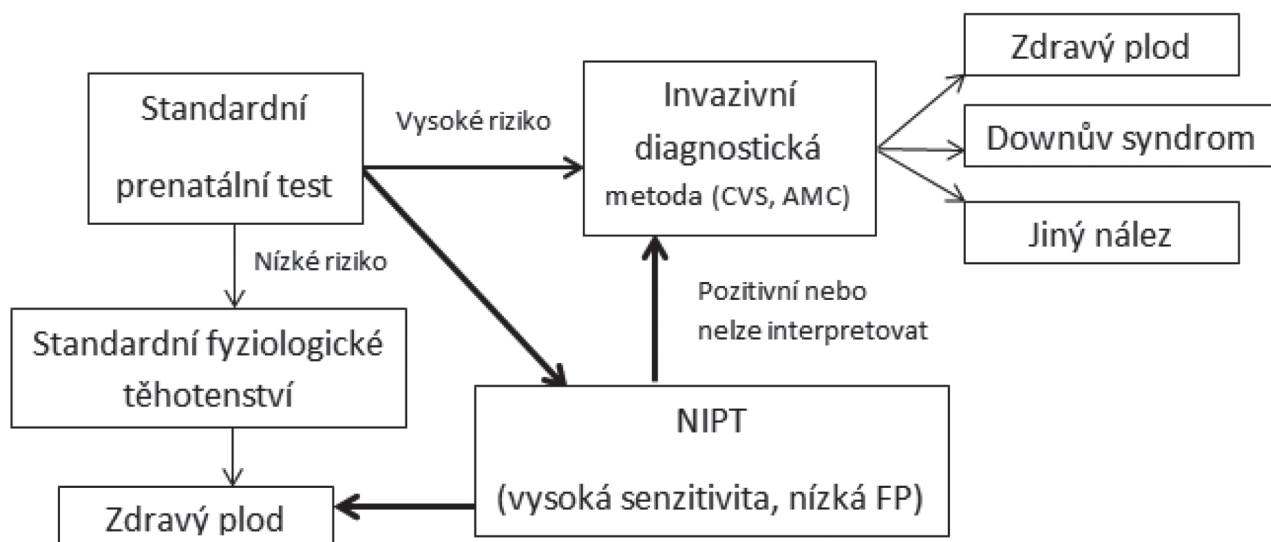
2. Provádění NIPT

NIPT je možno provádět od 10. týdne těhotenství, při čemž pro validní výsledek se doporučuje stanovení fetální frakce (obsahu cffDNA plodu), která by měla být vyšší než 4%. V současné době je možné test provádět buď jako základní screeningový test také u nízkorizikové populace, nebo může být proveden v kontingenčním režimu pro ověření pozitivních výsledků získaných standardním způsobem screeningu.

Toto doporučení je v souladu s doporučením České gynekologické a porodnické společnosti (ČGPS) (Čes. Gynek., 77, 2012, No. 3, p. 265-266) a Společnosti lékařské genetiky (SLG) ČLS JEP (Klin. Biochem. Metab., 22 (43), 2014, No. 1, p. 40-42).

Zkratky

hCG	lidský choriový gonadotropin
volný β hCG	volná beta podjednotka choriového gonadotropinu
AFP	alfa 1 fetoprotein
uE3	volný estriol
PAPP-A	specifický těhotenský protein A
PIGF	placentární růstový faktor
RIA	kompetitivní radioimunoanalýza
IRMA	sendvičová radioimunoanalýza
TRACE	fluorescenční imunoanalýza patentovaná B.R.A.H.M.S.



Efektivita standardního screeningu versus NIPT

Předpoklad: 100.000 těhotných žen, prevalence Downova syndromu 1:500

Typ screeningu	senzitivita (%)	FPR (%)	Počet identifikovaných plodů s DS	Počet FP výsledků	PPV testu
Kombinovaný test	90	5	180	4,991	1 z 28 (3,57 %)
Integrovaný test	90	2	180	1,996	1 z 12 (8,33 %)
cfDNA test	99	0,2	198	0,4	1 ze 2 (50 %)

DR	Detection rate – výtěžnost
PPV	Positive predictive value
FPR	False positive rate – falešná pozitivita
CRL	temeno-kostrční vzdálenost
UZ markery	ultrazvukové markery
NT	nuchální translucence
NB	Nose bone – nosní kost
TR	Trikuspidální regurgitace
DV	Ductus venosus
FMF	Fetal Medicine Foundation – Nadace fetální medicíny z Londýna
cfDNA	cell free DNA – mimobuněčná DNA
cffDNA	cell free fetal DNA – mimobuněčná DNA fetálního původu
CVS	Odběr choriových klků
AMS	aminocentéza
RfB	Referenzinstitut für Bioanalytik
UK NEQAS	United Kingdom National External Quality Assessment Schemes
SEKK	Systém externí kontroly kvality

Literatura

1. **Driscoll, D. A., Gross, S.** Prenatal Screening for Aneuploidy. *N. Engl. J. Med.* 2009, 360: p. 2556-2562.
2. **Loucký, J., Springer, D., Zima, T.** Možnosti screeningu Downova syndromu v České republice, *Česká gynekologie*, 73, 2008, 3, p. 160-162
3. **Malone, F., Canick, J. A., Ball, R. H., Nyberg, D. A., Comstock, C. H., Buckowski, R. et al.** First- trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syn-

- drome. First and Second-Trimester Evaluation of Risk (FASTER) Research Consortium. *N. Engl. J. Med.* 2005, 353: p. 2001-11.
4. **Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada, Board of the Canadian College of Medical Geneticists.** SOGC Clinical Practice Guideline No. 187, February 2007. Prenatal Screening for Fetal Aneuploidy. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 2007, 29(2): p. 146-161.
5. **Spencer, K. Cowans, N. J., Molina, F., Kagan, K. O., Nicolaides, K. H.** First-trimester ultrasound and biochemical markers of aneuploidy and the prediction of preterm or early preterm delivery. *Obstet. Gynecol.* 2008, 31: p. 147-52.
6. Screening for Down's syndrome: UK NSC Policy recommendations 2011–2014 Model of Best Practice Available online at <http://anr-dpn.vjf.cnrs.fr/sites/default/files/NSCModel-of-Best-Practice-DS%20screening2011-2014Sept2011.pdf>
7. **Nicolaides, K. H.** Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2004, 191: p. 45-67.
8. **Wald, N. J., Rodeck, C., Hackshaw, A. K., Walters, J., Chitty, L., Mackinson, A. M.** First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS). *Health Technology Assessment* 2003, 7: p. 24-27
9. **Benn, P. et al:** Position Statement from the Aneuploidy Screening Committee on Behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis, April 2013. Available online at www.ispdhome.org

Příloha č. 1

1. Závazná preanalytika a analytika

1.1. Preanalytické požadavky

Analyt	Odebíraný materiál (*)	Stabilita séra (plazmy) +20 až 25 °C	Stabilita séra (plazmy) při +4 až +8 °C	Stabilita séra (plazmy) při -20 °C	Změna hladiny při nedodržení preanalytiky
Volný β hCG	Plná krev	6 h	1 d	1 r	
hCG	Plná krev	12 h	3 d	1 r	-
AFP	Plná krev	12 h	7 d	1 r	-
Volný estriol (uE3)	Plná krev	6 h	1 d	1 r	
PAPP-A	Plná krev	12 h	3 d	1 r	-
PIGF	Plná krev	12 h	1 d	1 r	-

*Vlastní stanovení se provádí v krevním séru nebo plazmě.

Plnou krev je vhodné doručit do laboratoře do 3 h po odběru, nejpozději však do 8 h. Po odběru je potřeba co nejdříve separovat sérum pro stanovení volného β hCG a uE3.

1.2. Analytické požadavky I.

Pro všechny používané biochemické parametry (volný β hCG, hCG, AFP, uE3, PAPP-A, PIGF) je vyžadována každoroční verifikace metody.

Analyt	Návaznost*	Doporučené metody
Volný β hCG	WHO 4 th IS NIBSC (WHO, 1 st IRP 75/551)	TRACE, IRMA, chemiluminiscenční a elektrochemiluminiscenční metody
hCG	WHO 4 th IS NIBSC (WHO, 1 st IRP 75/537)	RIA, IRMA, TRACE, chemiluminiscenční, fluorescenční a elektrochemiluminiscenční metody
AFP	WHO 1 st IS NIBSC	IRMA, TRACE, fluorescenční, chemiluminiscenční a elektrochemiluminiscenční metody
Volný estriol (uE3)	Ref. metoda: Siekmann et al., J. Steroid Biochem. 11 (1979) 117-123 RfB Bonn (G)	RIA, chemiluminiscenční metody
PAPP-A	WHO IRP 78/610	TRACE, ILMA, IRMA, chemiluminiscenční a elektrochemiluminiscenční metody
PIGF	Placental growth factor Ala 21 - Arg 149, human, rDNA-derived (PIGF, PIGF-1) NIBSC 09/272	TRACE, ILMA, IRMA, chemiluminiscenční a elektrochemiluminiscenční metody

*Podrobné a průběžně aktualizované informace o referenčních metodách a referenčních materiálech lze nalézt např. na webové adrese <http://www.bipm.org> (konkrétně např. dokument http://www.bipm.org/utis/en/xls/jctlm_listl.xls, dostupné též z www.cskb.cz a www.cmi.cz) nebo jen o referenčních materiálech na webové adrese: <http://www.nibsc.ac.uk/>

1.3. Analytické požadavky II.

Pro všechny používané biochemické parametry (volný β hCG, hCG, AFP, uE3, PAPP-A, PIGF) musí být opakovatelnost* do 6 % a reprodukovatelnost do 10 %**

Průměrná hodnota získaná z měření tří kontrolních vzorků s různými koncentracemi analytu (volnými v rozmezí celého pracovního rozsahu metody - každý v jeho jiné třetině). Měření je prováděno: *) minimálně 6x za podmínek opakovatelnosti, **) minimálně 10x za podmínek reprodukovatelnosti (pokaždé v jiném dni)

2. Verifikace a nejistota měření

Pro měření sledovaných parametrů používá laboratoř pouze validované metody. Validaci in vitro diagnostik (s CE značkou) provádí jejich výrobce. Nejsou přípustné jakékoliv změny metodiky. Laboratoř má provedenu verifikaci metod a stanovenou rozšířenou nejistotu měření v souladu s doporučením odborných společností např. www.cskb.cz Doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků měření/ klinických testů v klinických laboratořích.

3. Doporučené systémy externí kontroly kvality

Pro 1. trimestr – RfB, INSTAND, SEKK, UK NEQAS

Pro 2. trimestr - RfB, SEKK, UK NEQAS