

Novorozenecký screening

MUDr.Hana Vinohradská

OKB FN Brno

Definice NS

- Aktivní celoplošné vyhledávání choroby v populaci všech novorozenců v jejím preklinickém stadiu
- Vyhledávání pomocí laboratorní metody – princip analýzy tzv. suché kapky krve na filtračním papírku odebrané standardním způsobem

Kriteria pro NS

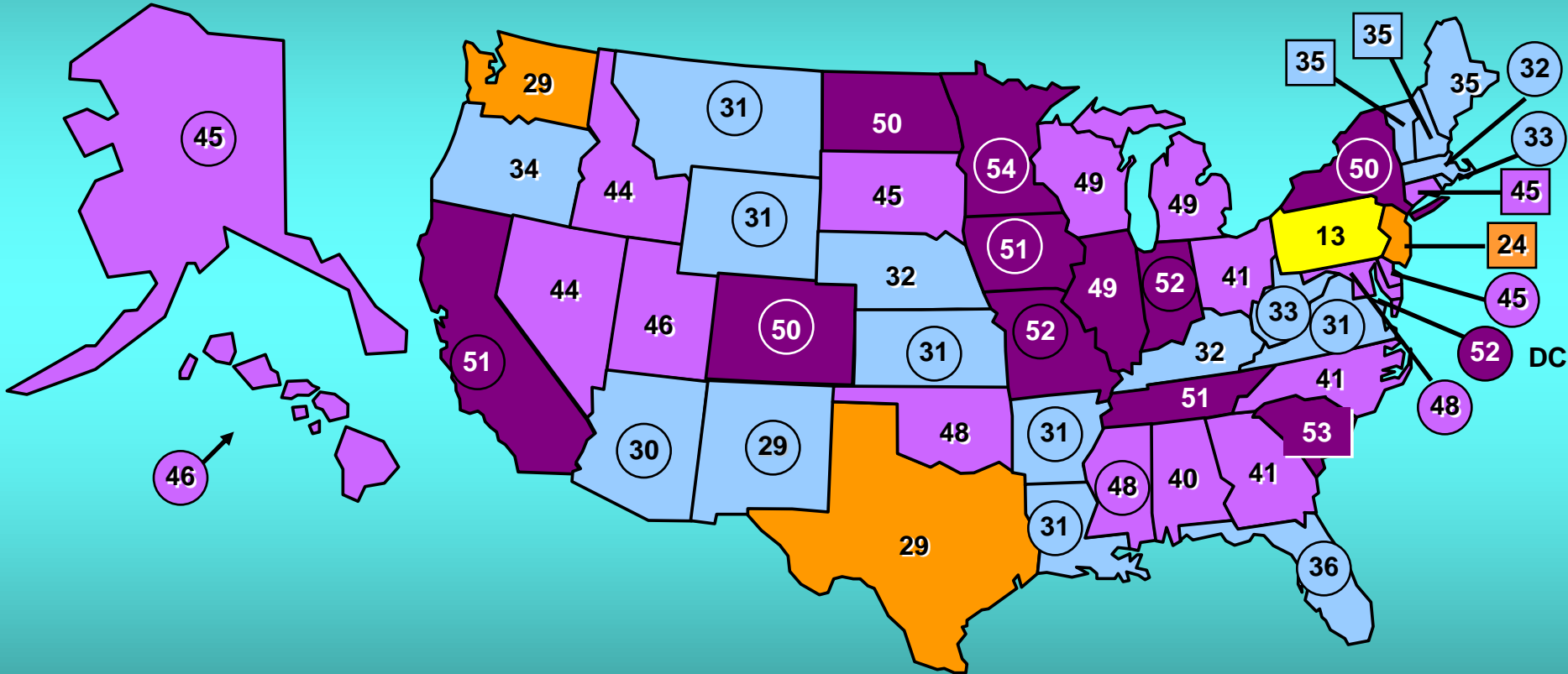
- vyšetřovaná choroba je jasně definována
- představuje významný zdravotně sociální problém (incidence 1: 50 – 100 000)
- existuje obecně uznaný screeningový test s jasně definovanými parametry (cut off, recall...)
- včasná diagnóza umožňuje takovou léčbu, která zásadně pozitivně ovlivní průběh nemoci
- společnost je schopna zabezpečit NS a následnou péči o zachycené pacienty po stránce organizační a ekonomické

Historie NS

- **Robert Guthrie** (1916 – 1995) – americký mikrobiolog, zakladatel NS, který v souvislosti s hledáním vhodného testu pro screeningové vyšetřování novorozenců na fenylketonurii poprvé použil papírek nasáknutý krví (r.1960).
- kolem r.1963 – rychlé rozšiřování screeningu PKU v USA, později i jinde .



NS USA-2009



Historie NS v ČR

- **Fenylketonurie/hyperfenylalanin.** – od r.1975
- **Kongenitální hypotyreóza** – od r. 1985
- **Kongenitální adrenální hyperplázie** – od r.2006
- **Cystická fibróza** – od podzimu 2009
- **DPM dalších aminokyselin** - od podzimu 2009
- **DPM mastných kyselin** - od podzimu 2009
- **Některé organické acidurie** – od podzimu 2009

Organizace NS v ČR

- Věstník MZ ČR, částka 6, vydán 12.8.2009
- Metodický návod k zajištění novorozeneckého celoplošného laboratorního screeningu a následné péče

Rozdělení NS dle metodiky vyšetřování

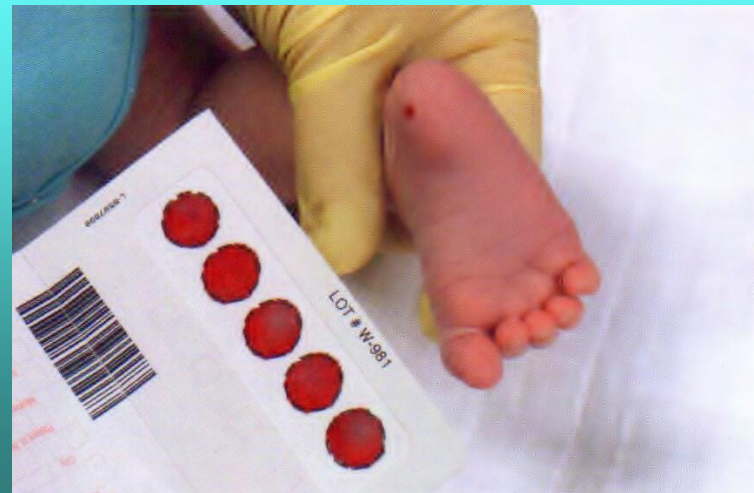
- **Fluoroimunoanalytická metoda DELFIA**
 - kongenitální hypotyreóza
 - kongenitální adrenální hyperplázie
 - cystická fibróza
- **Tandemová hmotnostní spektrometrie MS/MS**
 - fenylketonurie a další poruchy metabolismu AMK
 - DPM mastných kyselin
 - některé organické acidurie

Laboratoře NS v ČR

- Pro imunoanalytické metody:
 - 1) FN KV Praha, laboratoř NS
 - 2) FN Brno, OKB PDM, laboratoř NS

- Pro metody MS/MS:
 - 1) VFN Praha, ÚDPM
 - 2) FN Olomouc, laboratoř DPM

Odběr krve pro novorozenecký screening



Odběrová kartička pro novorozenecký screening

Požadavek (zaškrtnout): SKH: <input type="checkbox"/> CAH: <input type="checkbox"/> Jiný (vypsat): <input type="checkbox"/>		Odběr: První: <input type="checkbox"/>
Jméno novorozence		Opakovaný: <input type="checkbox"/>
Jméno	Příjmení	
Rodné číslo, pojišťovna <small>(dítě nebo matka)</small>	Porodní hmotnost g	
Datum a čas narození <small>DD.MM.RRRR – HH:MM</small>	Datum a čas odběru <small>DD.MM.RRRR – HH:MM</small>	
Kódové číslo odběru <small>Kód oddělení (AAA) • pořadí odběru (XXX) - AAXXXX</small>	Praktický dětský lékař Jméno, telefon	
Jméno matky		
Jméno	Příjmení	
Telefon matka (rodina) <small>Mobil i pevná linka</small>	Adresa matky (pobytu)	
Odesílatel vzorku <small>Čitelné razítko, jméno, podpis</small>		

Whatman 903[®] Lot 6272207/51 2009-05 SN 0004305

SN 0004305

Kartičku vyplnit před odběrem
Nedotýkat se oblasti pro kapky krve
Při poškození kartičku nepoužít

CE IVD REF 10539735 Rev.0 LOT 6272207/51

Whatman GmbH
Hahnstraße 3,
37586 Dassel Germany

Odběr krve

- Odběr kapilární krve provést mezi 48-72 hod. po narození
- Vybrat vhodnou kartičku - t.č.používán typ Whatman 903
- Kartičku před odběrem řádně popsat potřebnými identifikačními údaji
- Desinfikovat alkoholem, nechat zaschnout
- Pro odběr použít kopíčko-lancetu (ne jehlu)
- První kapku krve setřít (pro odběr nepoužít)
- Odebrat dostatečné množství krve, vyznačené kruhové zóny nechat nasáknout z jedné strany, volně prosáknout na druhou stranu

Manipulace s kartičkou

- Krev po odběru nechat dobře zaschnout volně při pokojové teplotě, nevystavovat vysokým teplotám (slunce, topení, nesušit fénem)
- Zabránit kontaminaci odběrových zón (krev z jiné kartičky, prach, polití...)
- Odeslat do příslušné laboratoře – dle typu požadovaného vyšetření



15°C
- 22 °C



SKS - výhody

- Snadná **dostupnost** BM – jednoduchý odběr kapikární krve
- Snadná **transportovatelnost** (možnost zasílání poštou i na značné vzdálenosti bez ohrožení preanalytiky)
- Snadná **manipulace** s materiálem v laboratoři
- Dlouhodobá **skladovatelnost** (stabilita jednotlivých analytů však musí být vždy ověřena)

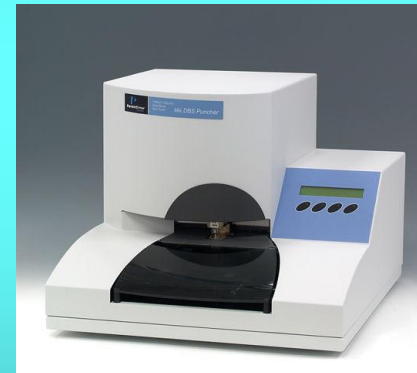
Důležité: dodržení požadavků v preanalytické fázi (odběr, transport) a podmínek pro skladování!

Získávání krevních terčů

Krevní terče získáváme pomocí jednoduchých nástrojů až po složitá zařízení

- Kleště
- Jednoduché razičky
- Automatické razičky

Velikost terčů: obvykle o průměru 1-6 mm



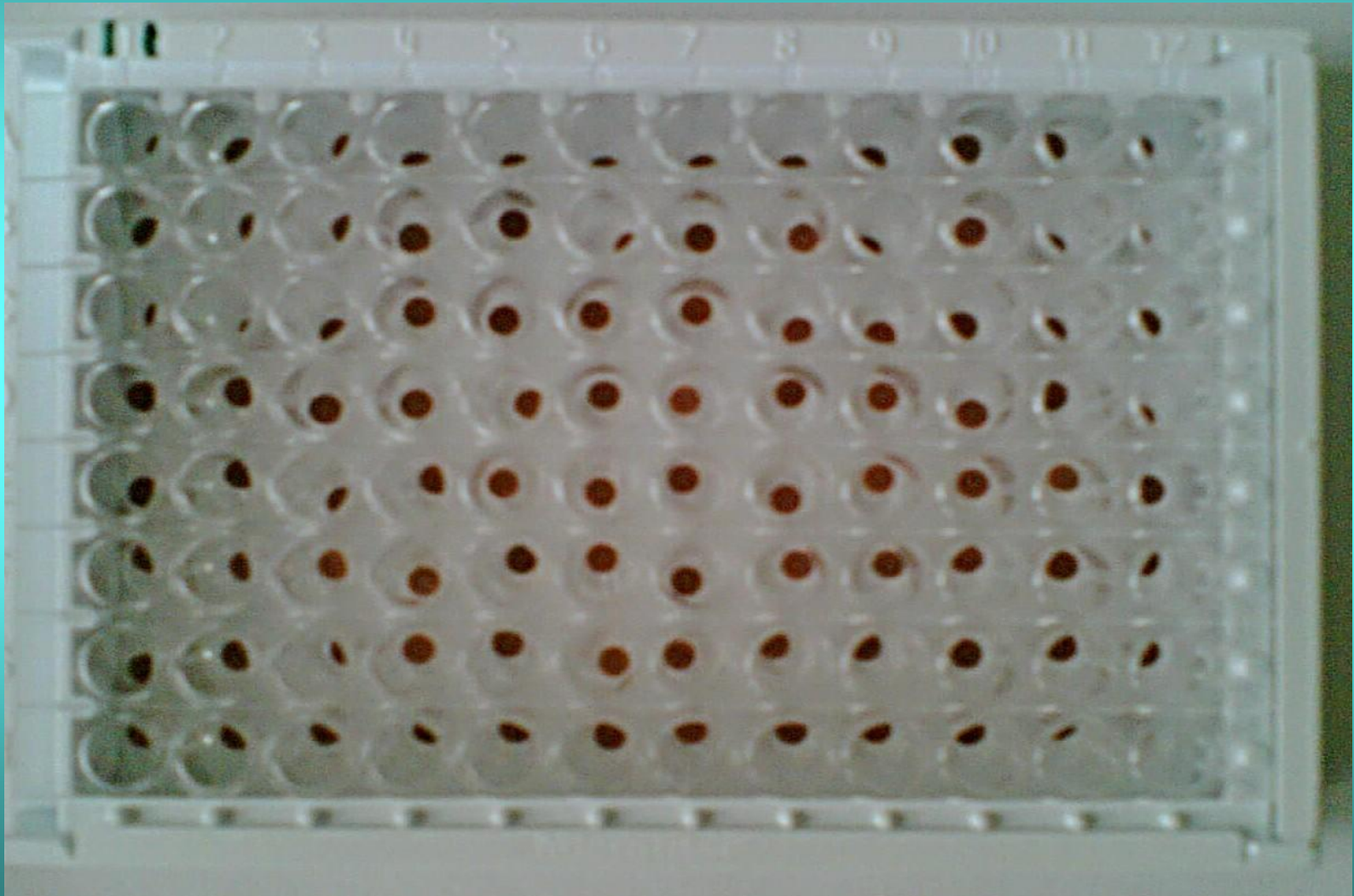
Odběrová kartička s terčíkem



Stanovované analyty v rámci NS

- **Substráty, metabolity** (aminokyseliny, acylkarnitiny, TSH, T4, 17 OHP...)
- **Enzymy** (galaktóza-1-fosfát, glukóza-6-fosfátdehydrogenáza, biotinidáza, imunoreaktivní trypsin...)
- **Protilátky** (IgM, IgG proti Toxoplazmóze)
- **DNA, RNA**
- ???

Mikrotitrační destička



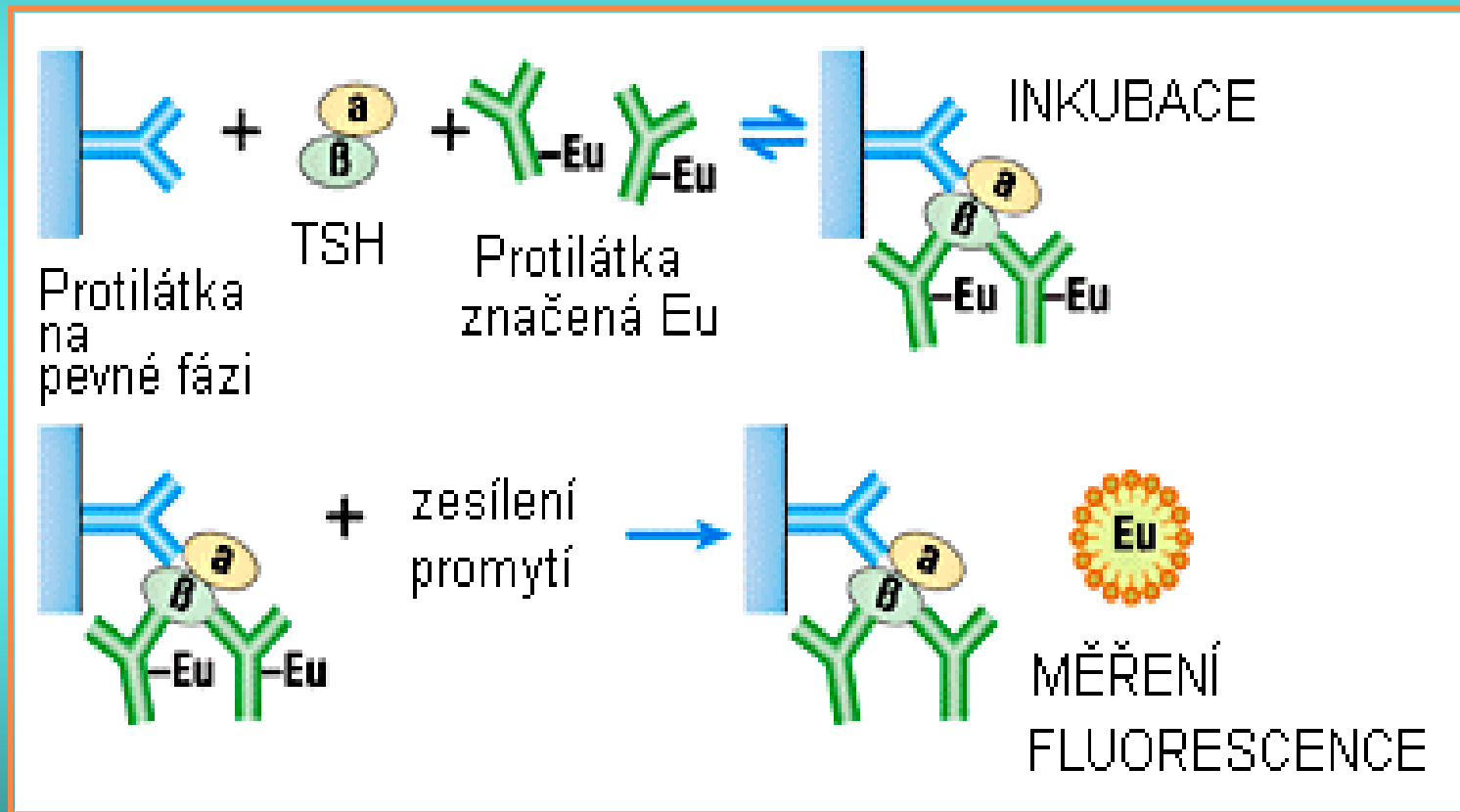
Princip stanovení imunochemických metod

- Analyt se měří ze suché krevní skvrny tzv. metodou **DELFI**A =Dissociation Enhancement Lanthanide Fluoroimmunoassay (systém finského výrobce firmy Wallac)
- Princip stanovení je založen na imunochemické reakci mezi protilátkou a antigenem. Analyt ze SKS vystupuje v reakci jako antigen.
- Reakce probíhá na mikrotitračních destičkách o 8x12 ti jamkách
- Na stěnách jamek je navázána příslušná protilátka
- Do jamky je vyražen terčík filtračního papírku nasáklý krví novorozence, která obsahuje stanovovaný analyt

Princip stanovení imunochemických metod

- Dále je do jamek přidána další značená protilátka či antigen značený chelátem lanthanoidového kovu Europia.
- Následuje inkubace přes noc, během které dojde k reakci za vzniku komplexu.
- Po proběhlé reakci a promytí se přidá zesilovací činidlo, tzv. enhancement, které uvolní značující látku tj. ion Europia. Ta vytvoří se složkami zesilujícího roztoku silně fluoreskující chelát.
- Fluorescence se měří přímo na mikrotitrační destičce

Princip DELFIA - graficky



Autodelfia – automatický imunoanalýzátor



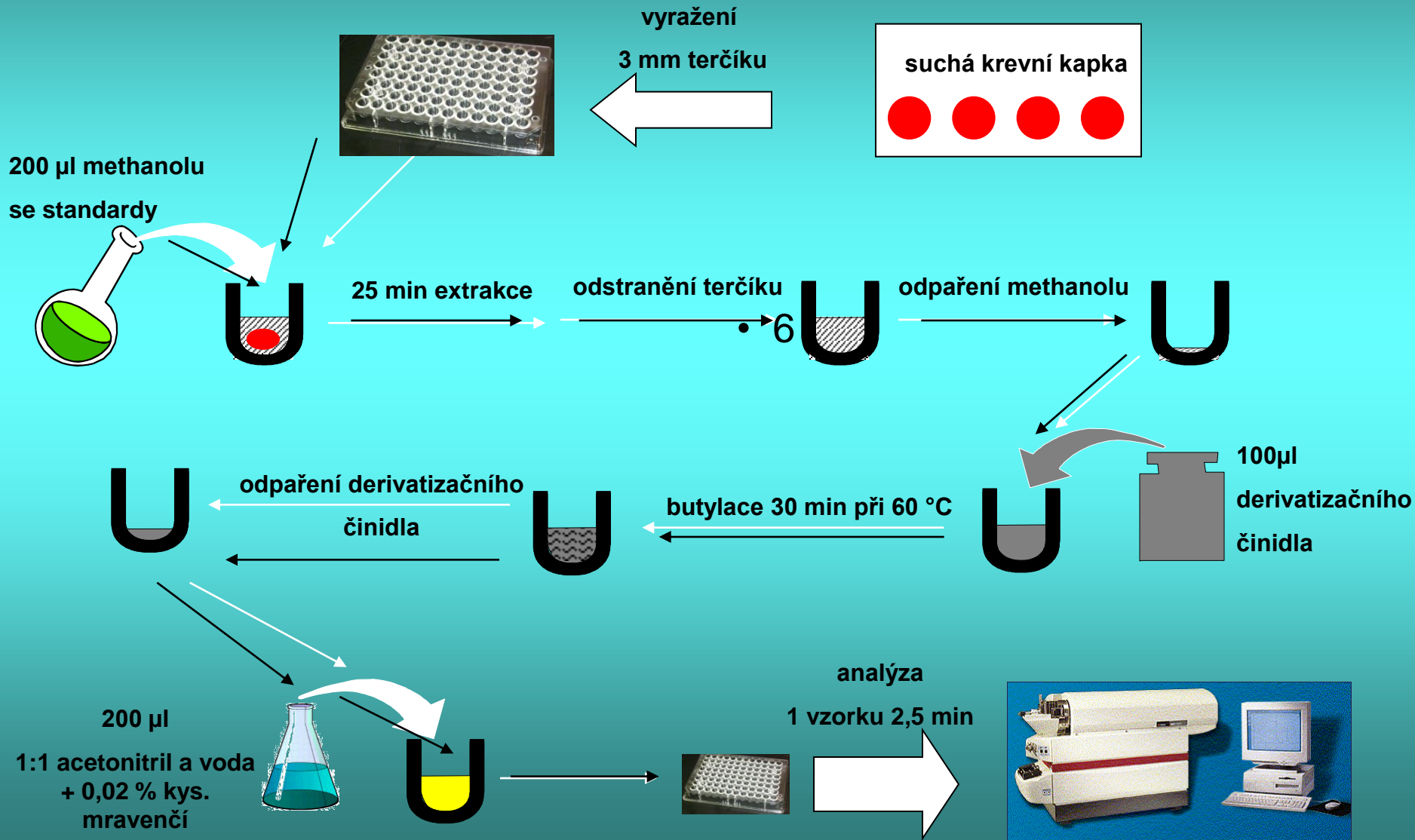
Tandemová hmotnostní spektrometrie

- Moderní analytická metoda
- Možnost stanovení více analytů v rámci jednoho vyšetření
- Široké spektrum metabolitů (AMK, acylkarnitiny, enzymy...)
- Vysoká specifita, citlivost a rychlost

Tandemový hmotnostní spektrometr (MS/MS)



Postup MS/MS metody



Kongenitální hypotyreóza

Příčiny:

- ageneze či dysgeneze štítné žlázy
- defekty hormonogeneze v důsledku snížené aktivity některých enzymatických systémů ve štítné žláze (peroxidázy, dejodázy...)
- blokáda štítné žlázy autoimunitními procesy
- transitorní hypotyreóza

Důsledek: při nedostatku T₃, T₄ → zpětnovazebně zvýšení TSH

Terapie: p.o. hormony štítné žlázy

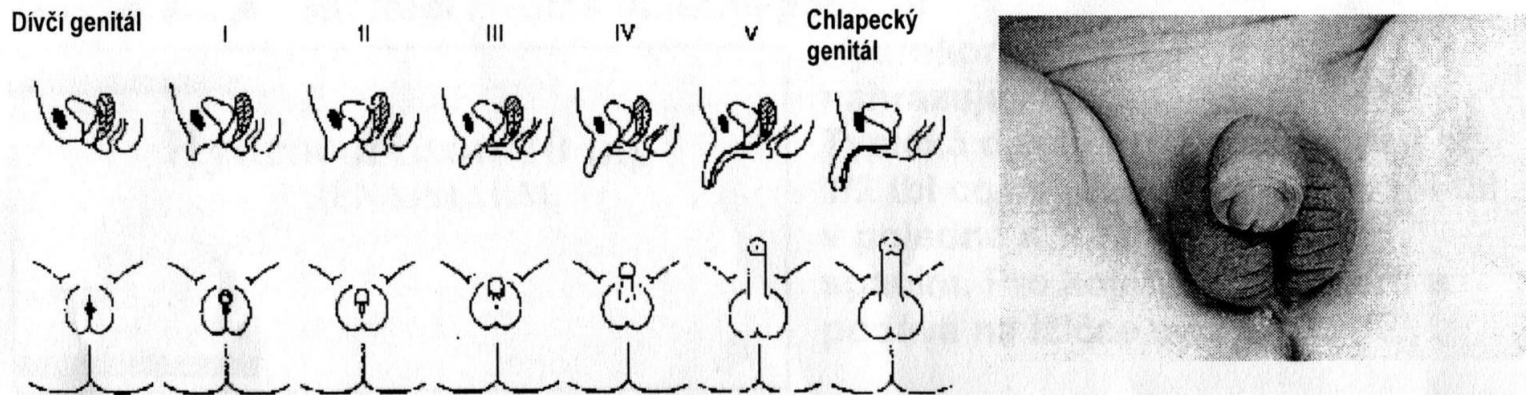
Kongenitální adrenální hyperplázie

Charakteristika: potenciálně fatální dědičné endokrinní onemocnění způsobené defektem steroidogeneze.

Příčina: deficit některého enzymu steroidogeneze, nejčastěji P450c21 (dříve 21-hydroxylázy)

Důsledek: nedostatek glukokortikoidů, případně mineralokortikoidů, nadbytek androgenů → krátce po narození dojde k metabolickému rozvratu, u děvčátek po narození různý stupeň virilizace genitálu

Možné malformace zevního genitálu u dívek (stupně maskulinizace dle Pradera):



Terapie:

- Akutně - hydrokortison i.v., mineralokortikoidy, glukóza, úprava vnitřního prostředí.
- Kortikoidy celoživotně.
- Chirurgická úprava genitálu u dívek s malformacemi.

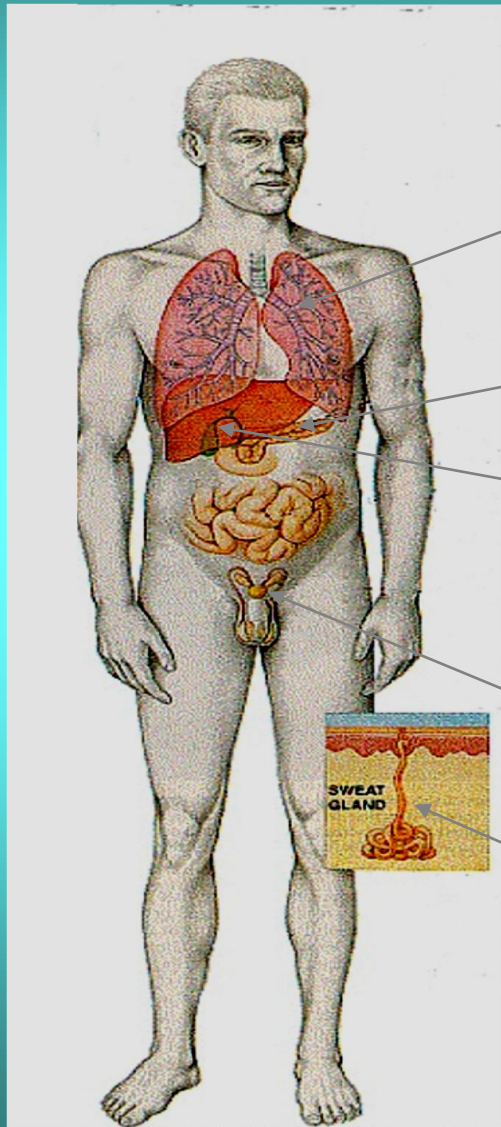
Novorozenec ženského pohlaví s CAH



Cystická fibróza (CF)

- **Charakteristika:** autosomálně recesívně dědičné onemocnění, závažná choroba, chronicky progredující, Incidence: 1 : 3000 v indoevropské populaci
- **Příčina:** mutace v CFTR genu, CFTR gen (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) objeven v r.1989
Přenašečem jedné z mutací CFTR genu je 1 z 25 Evropanů a 1 z 90 Asiatů
Nejčastější mutace: F508del, dnes známo asi 1800 CFTR gen (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) objeven v r.1989

Primárně postižené orgány



Dýchací cesty

Hustý hlen vede k obstrukci; infekce a sekundární zánětlivý proces k progresivní destrukci plic

Pankreas

Pankreatická insuficience, proteino-energetická malabsorbce

Játra, střevo

Jaterní léze, fokální biliární cirhóza
Mekoniiový ileus u novorozenců

Reprodukční trakt

Absence vas deferens, 95% mužů s cystickou fibrózou je infertilních. U žen vzácněji abnormální vazkost cervikál. hlenu

Kůže

Malfunkce potních žláz způsobuje zvýšený obsah soli v potu.

Cystická fibróza (CF)- pokračování

- **Diagnostika dříve:**

- Klinika

- Koncentrace chloridů v potu (potní test)

- Genetické vyšetření

- Pomocná vyšetření

Zobrazovací (RTG plic, břicha, snonografie, CT...)

Biochemická vyšetření: zbytky tuků, elastáza, ABR, markery zánětu

Mikrobiologické vyšetření sputa (Pseudomonas aeruginosa, Burgholderia cepacia, Stafylococcus aureus, Hemophilus influenzae)

Funkční vyšetření plic

- **Diagnostika dnes:**

- NS – stanovení IRT fluoroimonometodou DELFIA

Cystická fibróza (CF)- pokračování

- **Terapie:**

- **Symtomatická** (komplexní, intenzivní, tým odborníků + rodina)

Respirační projevy: boj proti infekci, péče o dobrou průchodnost dýchacích cest- ATB,dech.cvičení, masáže, domácí kyslíková léčba, transplantace plic)

Zaživací ústrojí: substituční terapie pankreatické insuficience, energetické výživové přípravky, vitamíny rozpustné v tucích

- **Kauzální** (genová)

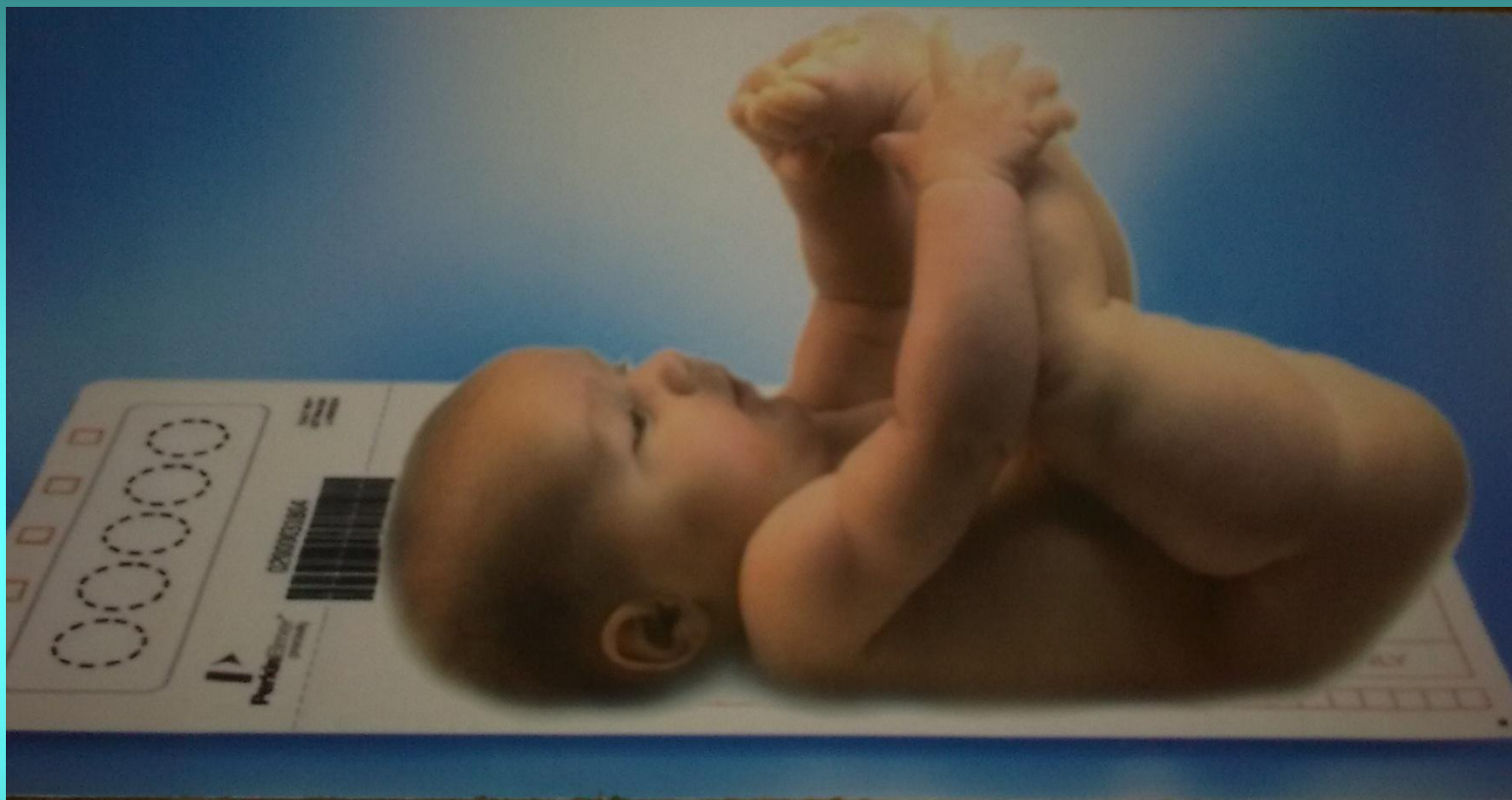
užití virových a nevirových vektorů

Poruchy metabolismu AMK

- obecný patogenetický mechanismus: akumulace toxického substrátu
 - chronická toxicita: např. Phe
 - akutní toxicita: větvené oxokyseliny či isovalerát
- cíle léčby: snížený přívod příslušné aminokyseliny v potravě + suplementace ostatních AMK preparátem

Poruchy beta-oxidace

- základní patogenetický mechanismus:
 - nedostatečná tvorba ketoláték při hladovění
 - akumulace toxických acylCoA
- klinické projevy:
 - obecně-hypoglykémie při hladovění
 - u některých nemocí-myopathie (zvláště při delší námaze), kardiomyopathie
- léčba: prevence hypoglykémie při katabolických stavech



Děkuji za pozornost