

BHCG & medical labs

Dr mehrdad vanaki

DCLS

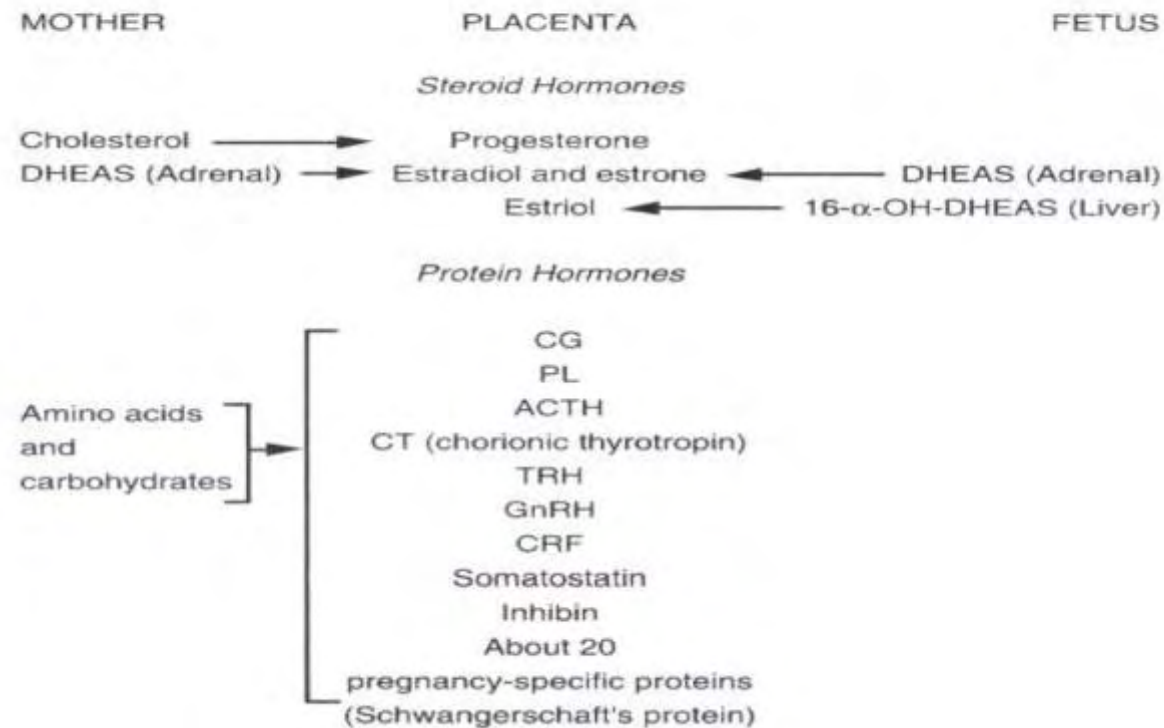
Trainer & consultant QMS in medical lab

How is it used(BHCG)?

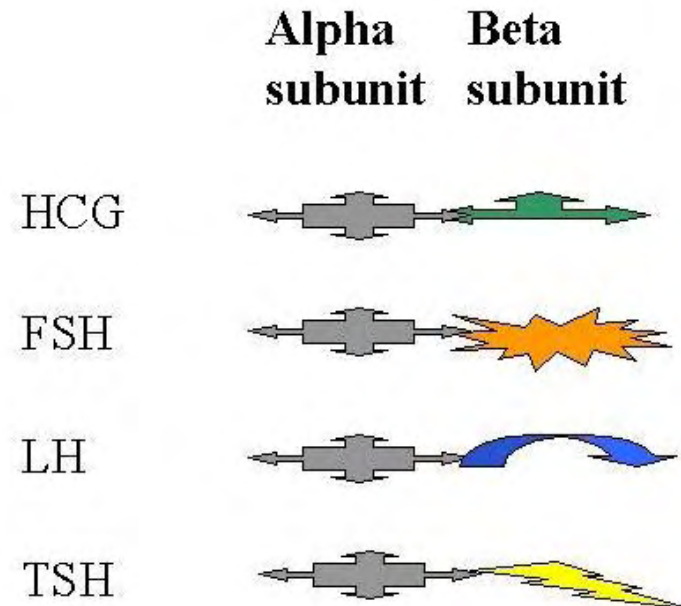
- Qualitative hCG testing detects the presence of hCG and is routinely used to confirm pregnancy.
- Quantitative hCG testing, often called beta hCG, measures the amount of hCG present in the blood. It may be ordered to help diagnose an ectopic pregnancy, to help diagnose and monitor a pregnancy that may be failing, and/or to monitor a woman after a miscarriage.
- A quantitative hCG test may also be ordered to help diagnose **gestational trophoblastic disease or germ cell tumors** of the testes or ovary.
- It may be ordered at regular intervals to monitor the effectiveness of treatment for these conditions and to detect tumor recurrence.

The best way to evaluate placental function or find trophoblastic diseases is measurement of the hormones produced by it , and the most specific hormone is hCG.

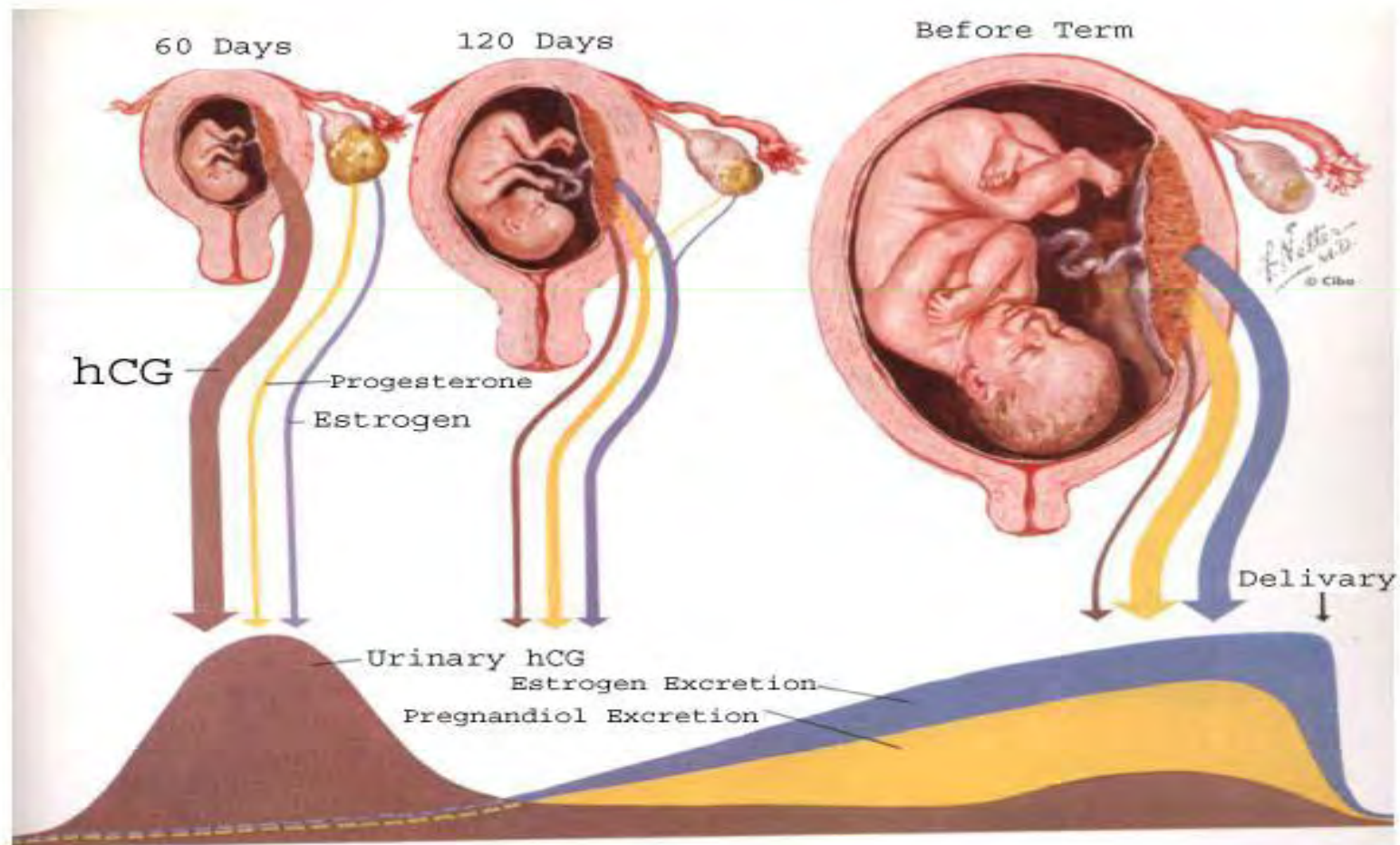
The hormones which are produced by placenta



hCG has two subunits , alpha and beta . The alpha subunit is similar in several other hormones too. But the beta subunit is specific for hCG. So for measuring hCG we had better measure this part.



During a normal pregnancy estrogen and progesterone are produced too. The sources of these hormones are placenta and ovary. The rate of secretion will differ during pregnancy and is shown below.



The situations which make a physician to order for a hCG measurement are listed below.

Indications for hCG Measurement:

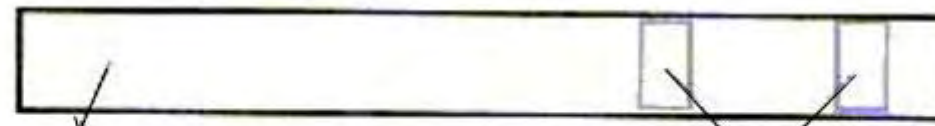
- 1- Probability of pregnancy (amenorrhea, abnormal uterine bleeding, and galactorrhea)
- 2- Before using medications (chemotherapy, contraceptive, steroids, tetracycline, and ...)
- 3- Before radiologic studies or radiotherapy.
- 4- Probability of ectopic pregnancy.
- 5- Probability of abortion.
- 6- Studying for down syndrome in a pregnancy.
- 7- Diagnosis and management of trophoblastic diseases

The methods that hCG is measured are as this :

- 1- Bioassay
- 2- Agglutination immunoassay
- 3- Radioimmunoassay
- 4- Radioreceptor assay
- 5- Immunometric assay
- 6- Home test kits

In home kit tapes there are three kinds of antibodies as shown below . One is against β - hCG where the urine is placed.The second is for alpha subunit of hCG and the third against the heavy chain of the first one.

The schematic view of a hCG Testape .



The place a drope of urine is inserted.

The lines which find color after appropriate reactions

The antibodies which are placed on the tape .

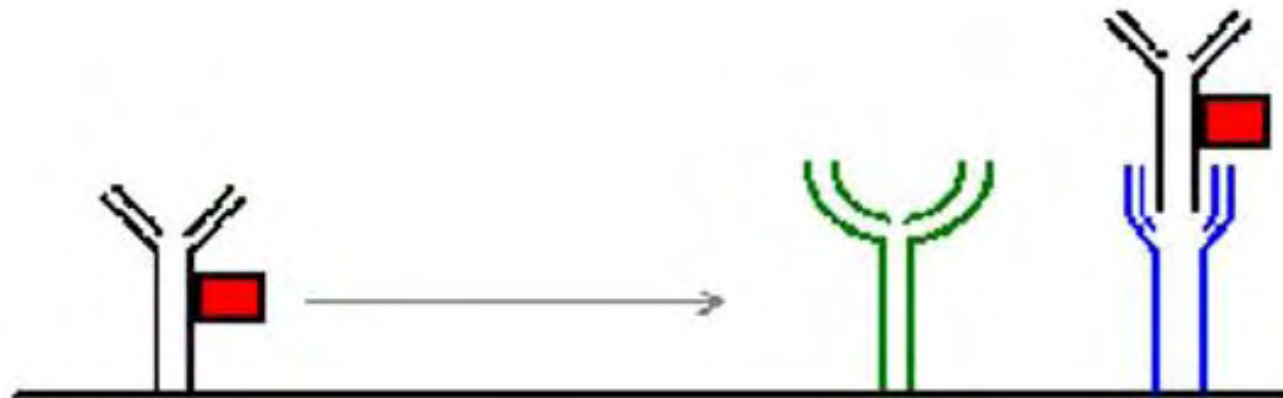


Ab against beta subunit of hCG with a chromogen enzyme and substance.

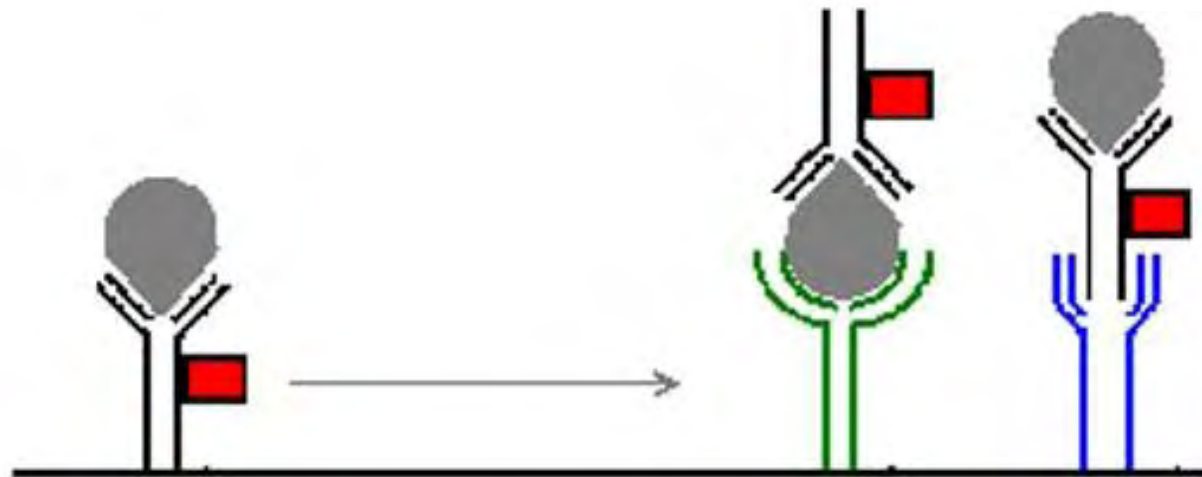
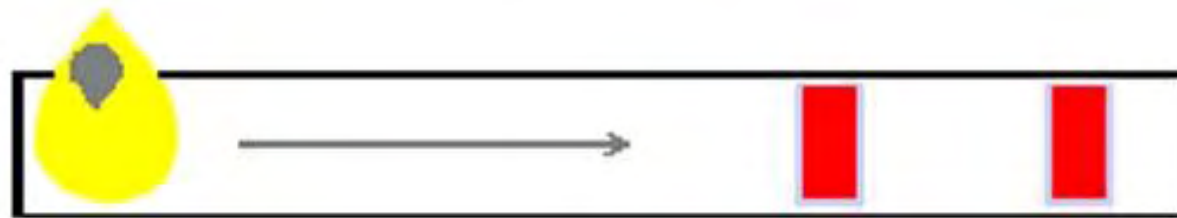
Ab against alph subunit of hCG.

Ab against the Ab of the bete-hCG

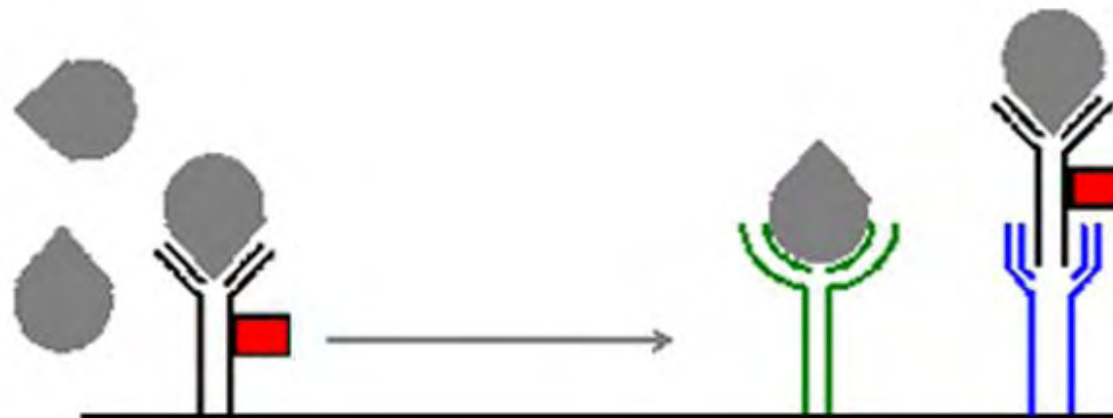
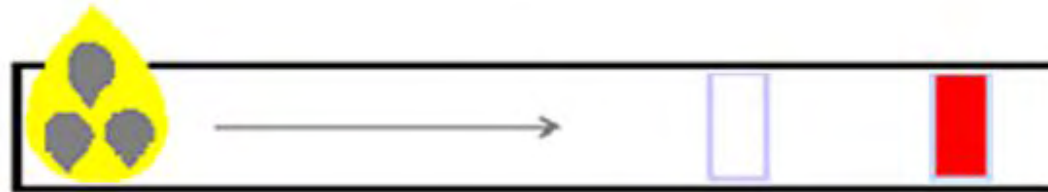
If the urine has no hCG the Ab of the β - hCG will move to the end of the tape lonely as the picture below and a single will be appear which means that the test is negative.



If some hCG exist in the urine tow line will be appeared and the test result is positive.

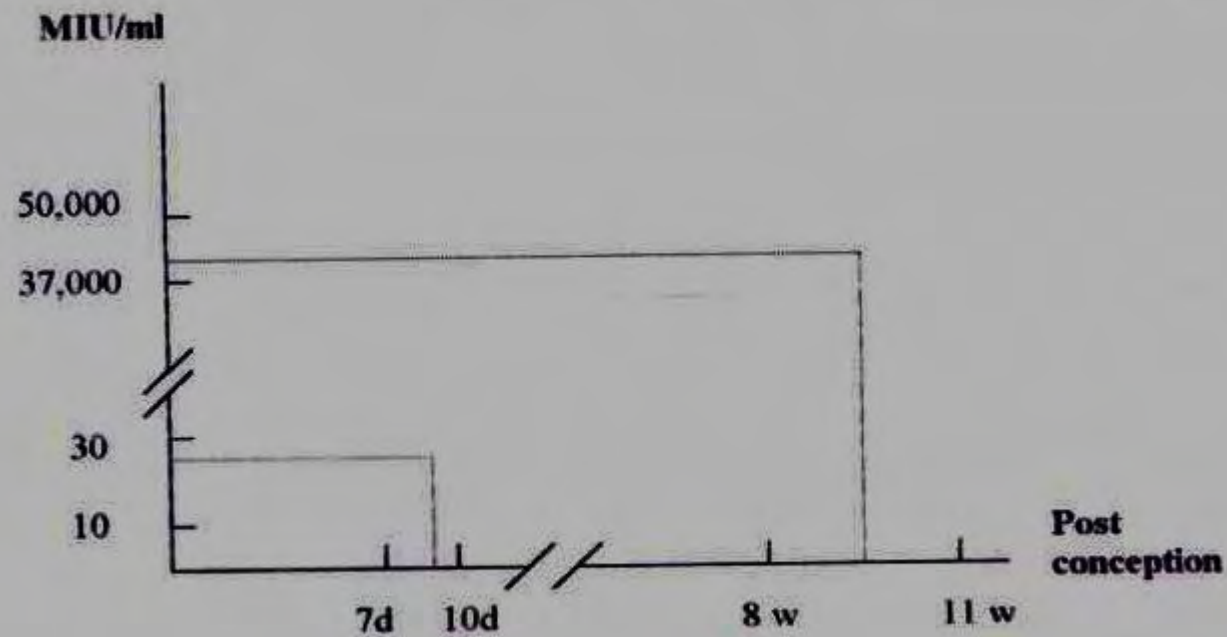


The home kit tests are not safe from hook effect !, which produce a false negative result . When the concentration of hormone is very high the hook effect will happen as the mechanism shown below .



The hCG concentration increases in a velocity that produces hook effect in early stages of the pregnancy. .

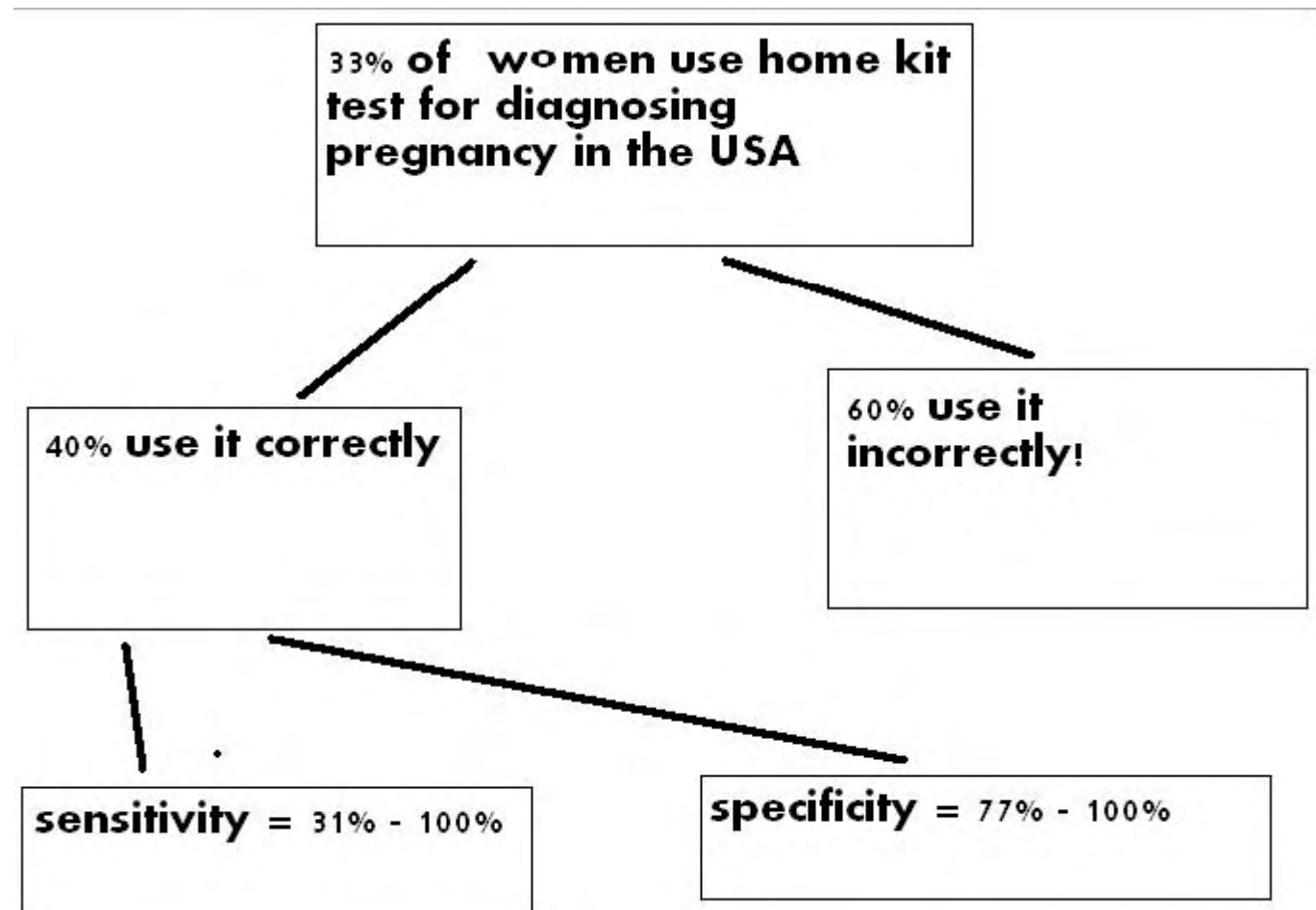
The concentration of hCG in the urine during pregnancy



How many days after a miscarriage would it take for a urine pregnancy test to show a negative result?

- Urine hCG decreases at about the same rate as serum hCG, which can take anywhere from 9 to 35 days, with a median of 19 days.
- However, the timeframe for when an hCG result will be negative is dependent on what the hCG level was at the time of the miscarriage. Frequently, miscarriages are monitored with quantitative blood hCG testing. If the levels of hCG do not fall to undetectable levels, some hCG-producing tissue may remain and have to be removed.

*The home kit tests of pregnancy are not reliable at all .
Because 60% of women use them incorrectly and the
others use them with a low sensitivity and specificity.*

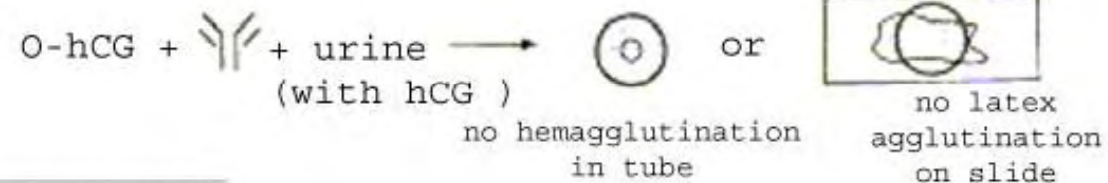


The sources of error in home kit tests are listed as below :

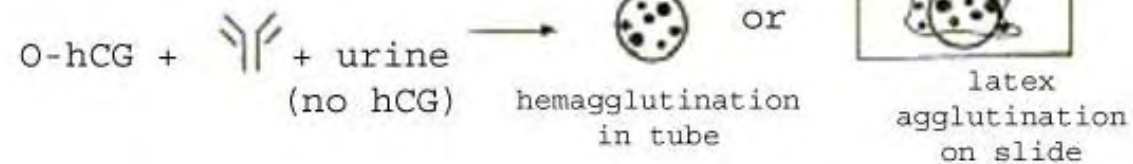
- 1 – Improper storage (improper temperature or humidity) .
- 2 – Improper temperature when the test is performed .
- 3 – Improper ph of the urine.
- 4 – Not spending enough time to read the test.
- 5 – Inappropriate volume of the urine used for the test.
- 6 – Drinking a lot of water before test.

In the hemagglutinin and latex agglutination inhibition tests hCG inhibits the reaction between Ab and Ag coated particles as seen below.

pregnant



nonpregnant



Key : O-hCG = hCG attached to RBC or latex particles

Hemagglutination assay and latex agglutination assay are compared as below.

	Sensitivity	Time
HAI	150-4000 mIU/ml	2 hours
LAI	500-3500 mIU/ml	Few minutes

If conception has occurred in the 8th day after ovulation the ELISA will show results more than 10. The home kit tests begin to be positive in the 10th day. The latex agglutination immunoassay is positive 21 days later!.

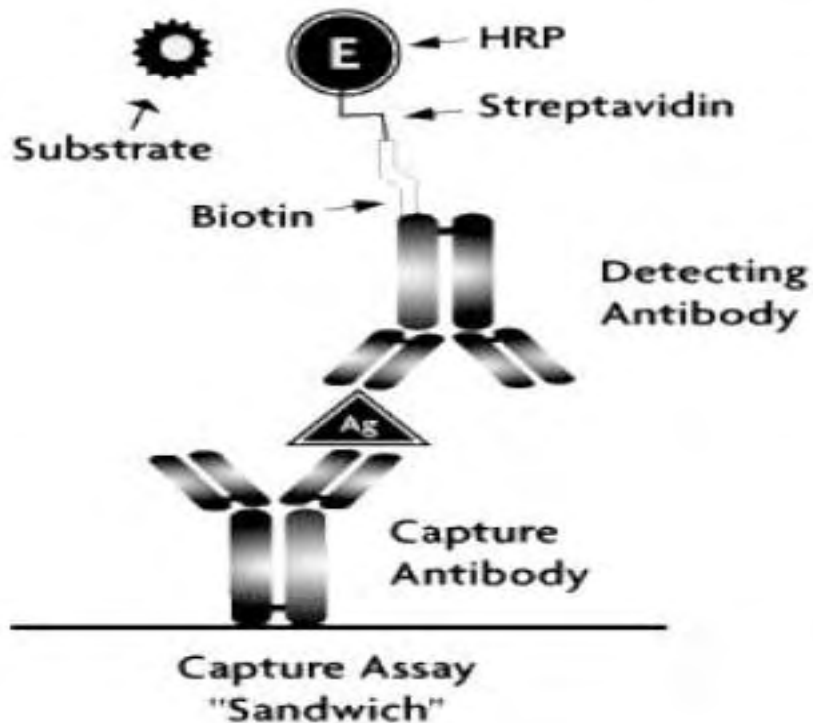
Days after ovulation	7	8	10	21
Implantation	*			
ELISA > 10		Red		
ICON +			Blue	
LAI +				Yellow

The positive and negative features of the agglutination inhibition assays .

Negative Features		Positive Features
Low sensitivity		It is cheap
Low specificity because of:	Wrong manner of the technician	It is rapid
	Wrong reading	
	Low concentrations of hCG	
	Proteinuria	
	Drugs	
	Hematuria	

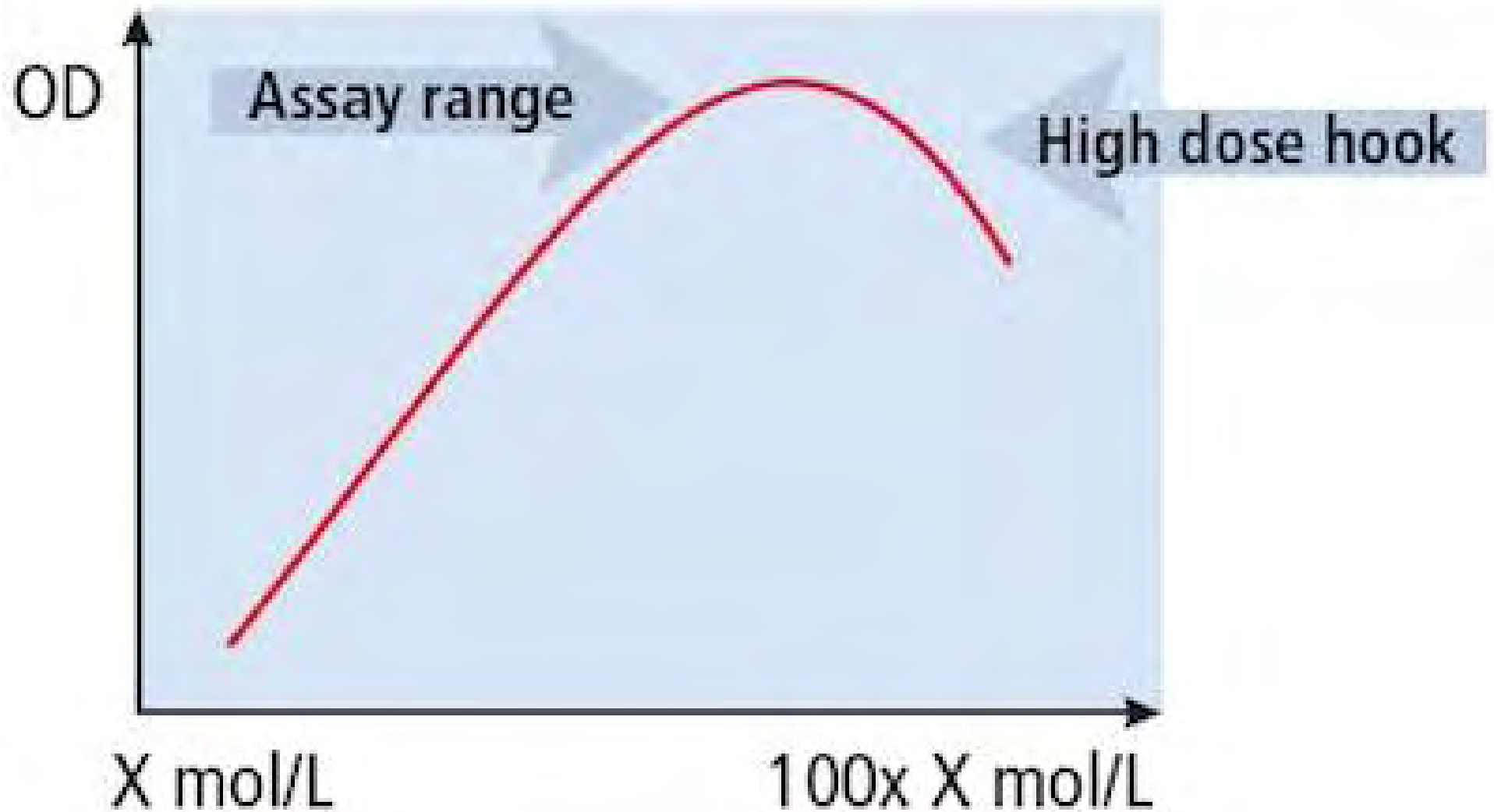
There are 3 kinds of methods for immunometric assays that each one has a solid phase and a sandwich complex is formed. This complex is the base of measurement.

Immunometric Assays



- 1 – IRMA
- 2 – IEMA
- 3 - ELISA

Hook effect BHCG



As any other laboratory method the enzyme immunometric assay has some advantages and some disadvantages which are shown here.

ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF ENZYME IMMUNOASSAY

A. Advantages

1. Sensitive assays can be developed by the amplification effect of enzymes.
2. Reagents are relatively cheap and can have a long shelf-life.
3. Multiple simultaneous assays can be developed.
4. A wide variety of assay configurations can be developed.
5. Equipment can be inexpensive and is widely available.
6. No radiation hazards occur during labeling or disposal of wastes.
7. Rapid simple EIA adaptable to automation can be developed.
8. Homogeneous EIA can be developed for haptens and proteins.

B. Disadvantages

1. Measurement of enzyme activity can be more complex than measurement of the activity of some types of radioisotopes.
 2. Enzyme activity may be affected by plasma constituents.
 3. Homogeneous assays at the present time have the sensitivity of 10^{-9} M and are not as sensitive as radioimmunoassays.
 4. Homogeneous EIAs for large protein molecules have been developed but require complex immunochemical reagents.
-

EIA, enzyme immunoassay.

From Nakamura (1992b). Reproduced with permission.

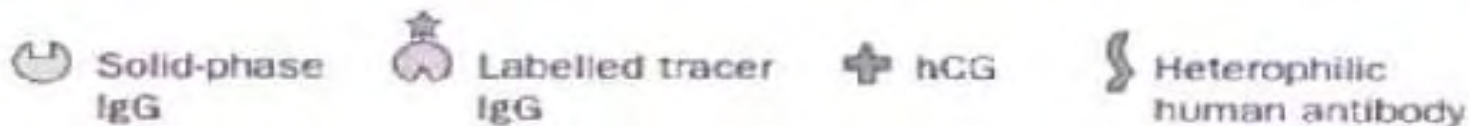
In rare cases heterophilic antibodies produce false positive results as seen below.

False-positive hCG with ELISA

True detection of hCG



False positivity due to heterophilic antibodies



نکات مهم در مورد موارد مثبت کاذب تست بتا ساب یونیت

- High FSH & LH
- High level Heterophil Ab in serum maternal
- High level RF in serum maternal
- Doping with external HCG (stimulate steroid hormone)
- Random analytical error (repeat HCG with other kit or method)
- Hyper level HCG with trophoblastic neoplasm or choriocarcinoma (fallow with CT & chemotherapy)
- Hyphophys HCG

False Negatives

Too early in pregnancy

Dilute/old urine

Ectopic

Incomplete Ab.

False Positives

Urine: hematuria/proteinuria

Serum:

T.O.A.

Thyrotoxicosis

Molar pregnancy

Drugs (MJ, ASA, Phenothiazines,
anticonvulsants,
antidepressants, methadone)

- Tests performed too early in the pregnancy, before there is a significant hCG level, may give false-negative results, while blood or protein in the urine may cause false-positive results. Urine hCG tests may give a false-negative result in very dilute urine. Women should not drink large amounts of fluid before collecting a urine sample for a pregnancy test.
- **Certain drugs such as diuretics and promethazine (an antihistamine) may also cause false-negative urine results. Other drugs such as anti-convulsants, anti-parkinson drugs, hypnotics, and tranquilizers may cause false-positive results.**
- There are reports of false-positive serum hCG results due to several different compounds (not drugs) that may interfere with the test. These include certain types of antibodies that may be present in some individuals and fragments of the hCG molecule. Generally, if results are questionable, they may be confirmed by testing with a different method.

heterophilic antibodies

- Some individuals have circulating factors in their serum that interact with the hCG antibody. **The most common are heterophilic antibodies.** These are human antibodies directed against animal-derived antigens used in immunoassays.
- **Individuals who have worked as animal laboratory technicians or in veterinary facilities or who were reared on farms are more likely to develop heterophilic antibodies.** Immunoassays of all kinds use animal antibodies. **People with heterophilic antibodies might have unusual results in a number of different kinds of assays.**
- However, because the animal antibodies are used in different amounts and with other reagents in each assay system, a person with heterophilic antibodies will not always have an unusual or unexpected result. Results can differ depending on the particular assay used

rule out the presence of **heterophilic antibodies**

- **A urine test (either quantitative or qualitative) for hCG can be performed. Because heterophilic antibodies are not present in urine**, if the urine test result is negative and the serum test result is persistently positive, interference in the serum immunoassay is confirmed if the serum value is ≥ 50 mIU/mL (3).
- **The assay can be rerun with serial dilutions** of the serum. Because heterophilic antibodies are directed to reagents in the immunoassay and not hCG, their interaction with the hCG curve will not be linear. Lack of linearity confirms assay interference.
- Some laboratories can **preabsorb serum to remove heterophilic antibodies before performing the assay**. If the result becomes negative after removal of the heterophilic antibody, interference can be confirmed

microheterogeneity of hCG,

- The size of the hCG molecule circulating in the blood of individuals may vary as a result of differences in the protein and carbohydrate structure of hCG. This type of variation is called ***microheterogeneity of hCG,***
- and it sometimes can account for **differences in measurements reported by different assays.** Additionally, some individuals may produce aberrant **forms of hCG that are not biologically active**—or are other hormones entirely—that will cross-react with the hCG assays. Still others may partly break down circulating hCG into nonbiologically active forms that react differently with the various assay systems. In these circumstances, substances other than native, biologically active hCG may be recognized by the assay system. **Repeating the hCG measurement in a different assay system can best detect this problem.**

Linearity curve BHCG

- **Wide variations between repeat runs of the same assay could result from serum factors interfering with the assay. Serial dilution of the specimen will be helpful in documenting nonlinearity and confirming the presence of interference.**
- **Finally, inherent assay factors can result in false-positive hCG results.** Repeat testing using a different assay system may confirm that the result was falsely positive if the result is now negative.
- **Patients with evidence of hCG assay interference should be notified that they are at risk for recurrent false-positive hCG assay results** These patients should be instructed to inform all future health care practitioners of this problem, and the information should be included in the patient's medical record

false-positive serum hCG results

- **Although false-positive serum hCG results are rare, if unrecognized, they may lead to unwarranted clinical interventions for conditions such as persistent trophoblastic disease.**
- **The physician must judge whether the risks of waiting for confirmation of results outweigh the risks of failing to take immediate action.**

There could be various reasons for a false positive rapid test.

- **Chemical Pregnancy**

A chemical pregnancy is basically **an early miscarriage**. Research has shown that half of all first pregnancies end in miscarriage. Due to the high sensitivity of home pregnancy tests, many women catch early pregnancies but end up going on to have their periods due to a chemical pregnancy.

- **Missed Reaction Time**

For accuracy in home pregnancy tests it is essential that you read the test results in the stipulated reaction time. If you let the test sit for too long (after the instructions on the box tell you), the test is invalid. This may cause it to show false positive results.

There could be various reasons for a false positive rapid test.

- **Chemical Interference**

Drugs that have the pregnancy hormone Human Chorionic Gonadotropin (hCG) in them can cause incorrect results in home pregnancy tests. The Human Chorionic Gonadotropin (hCG) in them may be responsible for the false positive pregnancy test. If you have had an HCG shot due to infertility treatments, you need to be sure the shot is out of your system before you attempt to use early pregnancy tests.

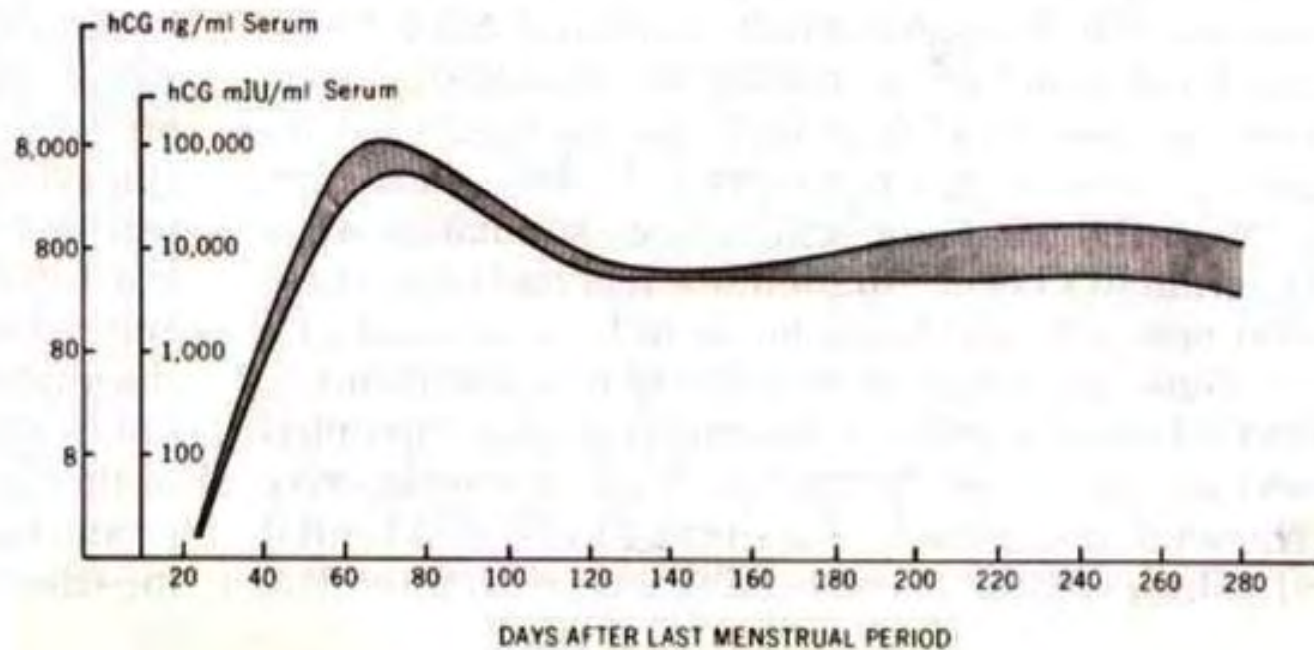
- **Evaporation Lines**

While technically not a true pregnancy, some pregnancy tests leave a faint evaporation line as the urine crosses the test. This faint very light grey evaporation line in the test area is often interpreted as a positive result.

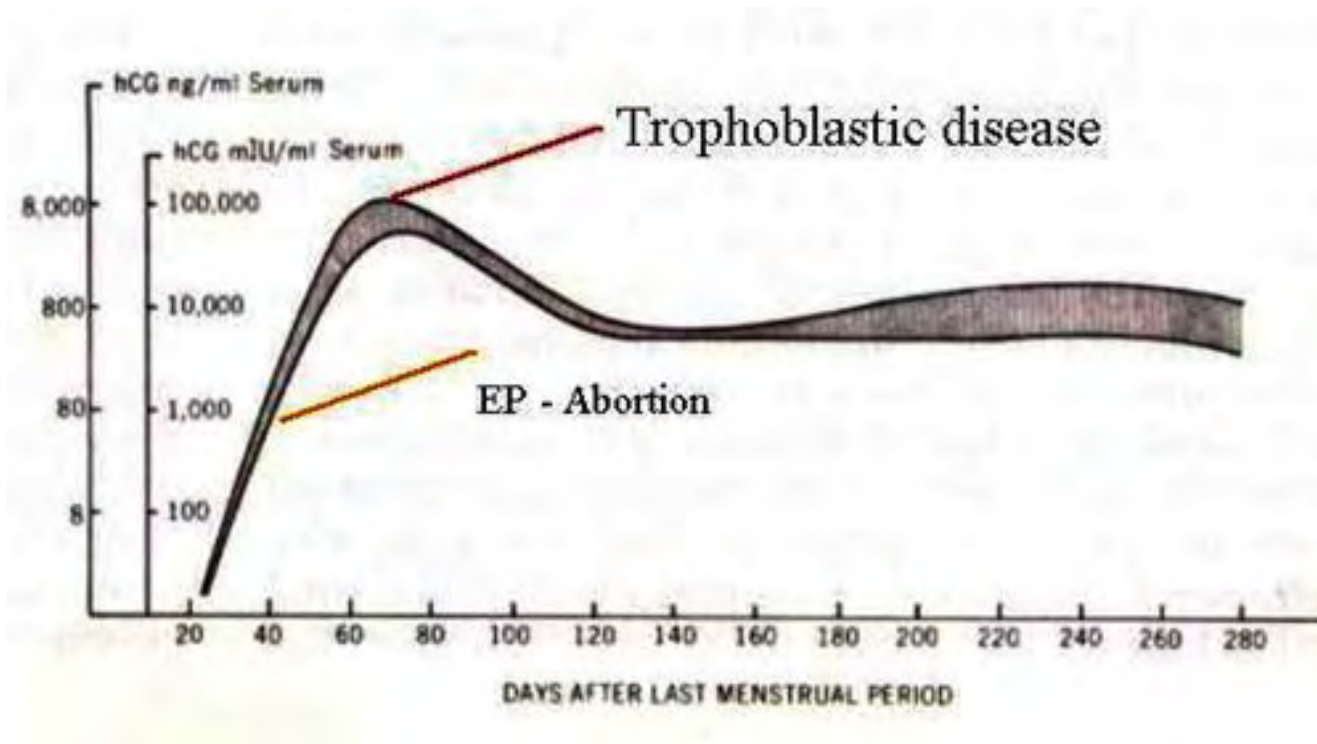
- [AimStrip pregnancy test strips](#) have a very good reputation of NOT leaving evaporation lines and are much less expensive than brands you can buy in your local supermarket or drug store.

- If you are not sure about your home pregnancy results it is recommended that you try again after a couple of days. If doubts regarding the results still persist, you must see a doctor for a pregnancy blood test. A blood test administered by your doctor is more sensitive than the early home tests and can be taken between seven and twelve days after you conceive

In a normal pregnancy the curve of hCG changes is as below. Information about this curve is very important .In early stages hCG will increase as twice every 48 to 72 hours. In other condition the pregnancy is abnormal.



Any aberration of hCG curve from its normal pattern shows some special conditions . For example the titers higher than normal (the red line below) show a trophoblastic disease. And it decreases in the titer (as the orange line below) is an abortion or ectopic pregnancy.



Different diseases can be diagnosed with conjugated measurement of hCG and unconjugated estriol and alpha fetoprotein.

uE3	hCG	AFP	Disease
↓ ↓	-	↑ ↑ ↑	anencephaly
↓	↑	↓	Trisomy 21
↓ ↓	↓	↓	Trisomy 18
↑	↑	↑	Twine
-	-	↑	duodenal atresia
-	-	↑	hydrocephaly
↓ ↓	↑ ↑ ↑	0	hydatidiform mole

hCG Level in Early Pregnancy

- **Many women wonder what the hCG level in early pregnancy is.**
- **In most normal pregnancies with hCG levels below 1,200 mIU/ml, the hCG usually doubles every 48-72 hours and increases by at least 60% every two days.**

hCG Level in Early Pregnancy

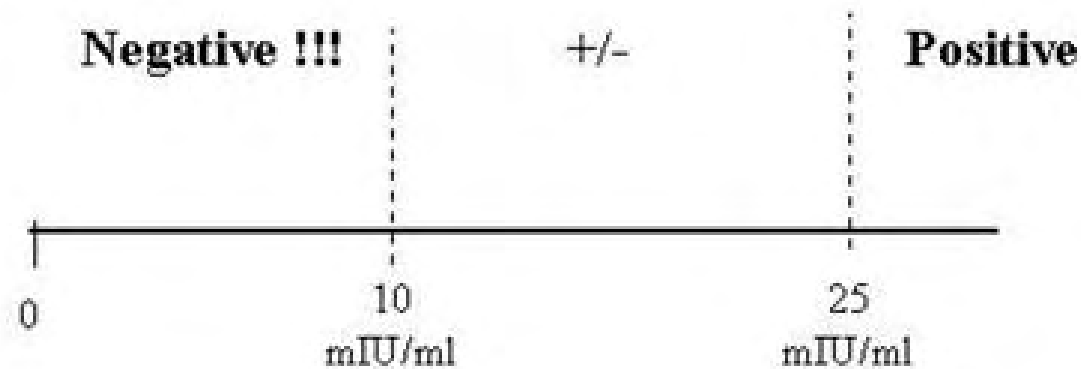
- **The HCG pregnancy hormone level has a wide range of normal levels in early pregnancy.**
- **the "pregnancy hormone" which is being produced by the placenta as soon as implantation happens about one week after fertilization and ovulation. hCG then continues to rise until about 10-12 weeks at which point it will stabilize or drop.**

Many women wonder whether they have a normal hCG level or not.

- **An hCG level below 5 mIU/ml is considered "not pregnant"**
- **An hCG level above 25 mIU/ml is considered "pregnant".**
- **An hCG level between 5-25 mIU/ml requires a follow-up test to confirm what it could be.**

The titers of hCG which are less than 10mIU/ml means a negative result of pregnancy and more than 25mIU/ml means positive. From 10 to 25 is doubtful and should be rechecked 3 days latter.

Interpretation of hCG titer for cofirming or assoiling a pregnancy



Serum HCG levels

From conception	From Lmp	IU/L
7days	3weeks	0to5
14days	28days	30to426
21days	35days	180 to 7,340
28days	42days	1080 to56,500
35-42days	49-56days(7-8 week)	7,650 to 229,000
43-64days	57-78days(8-10 week)	25,700 to 288,200
57-78days	79-100days	13,300 to 253,000
17-24weeks	2nd trimester	4060 to 65,400
After several days postpartum		Non-pregnant levels

hCG Levels

<i>Days from LMP</i>	Weeks from LMP	Events	Avg hCG mIU/ml	Range hCG mIU/ml
26	3w+5d		25	0-50
27	3w+6d		50	25-100
28	4w+0d	Missed period	75	50-100
29	4w+1d		150	100-200
30	4w+2d		300	200-400
31	4w+3d		700	400-1,000
32	4w+4d		1,710	1,050-2,800
33	4w+5d		2,320	1,440-3,760
34	4w+6d		3,100	1,940-4,980
35	5w+0d		4,090	2,580-6,530
36	5 1/7		5,340	3,400-8,450
37	5 2/7		6,880	4,420-10,810
38	5 3/7	yolk sac appears	8,770	5,680-13,660
39	5 4/7	yolk sac appears	11,040	7,220-17,050
40	5 5/7	yolk sac	13,730	9,050-21,040

41	5 6/7	yolk sac appears	15,300	10,140-23,340
42	6	heartbeat appears	16,870	11,230-25,640
43	6 1/7	heartbeat appears	20,480	13,750-30,880
44	6 2/7	heartbeat appears	24,560	16,650-36,750
45	6 3/7	embryo appears	29,110	19,910-43,220
46	6 4/7	embryo appears	34,100	25,530-50,210
47	6 5/7	embryo appears	39,460	27,470-57,640
48	6 6/7	embryo appears	45,120	31,700-65,380
49	7		50,970	36,130-73,280
50	7 1/7		56,900	40,700-81,150
51	7 2/7		62,760	45,300-88,790
52	7 3/7		68,390	49,810-95,990
53	7 4/7		73,640	54,120-102,540
54	7 5/7		78,350	58,200-108,230
55	7 6/7		82,370	61,640-112,870
56	8		85,560	64,600-116,310

A single measurement of hCG cannot be used to determine the gestational age or even to estimate a due date.

reference ranges previously quoted:

1 week since conception: 5-50 mIU/ML hCG

2 weeks since conception: 20-500 mIU/ML hCG

3 weeks since conception: 500-5,000 mIU/ML hCG

4 weeks since conception: 3,000-19,000 mIU/ML hCG

8 weeks since conception: 14,000-169,000 mIU/ML hCG

12 weeks since conception: 16,000-160,000 mIU/ML hCG

Rate of HCG rise

Below 1200 IU/L	Doubles every 48-72hrs
From 1200 to 6000IU/L	Doubles every 72-96 hrs
Above 6000IU/L	Doubles every 4 days

At hCG levels in early pregnancy below 1,200 mIU/ml the hCG usually doubles every 48-72 hours and it should normally increase by at least 60% every two days.

Between 1,200 and 6,000 mIU/ml serum hCG levels in early pregnancy, the hCG usually takes 72-96 hours to double

Above 6,000 mIU/ml, the hCG often takes over four or more days to double.

After 9-10 weeks of the pregnancy hCG levels normally decrease

Ectopic pregnancy,

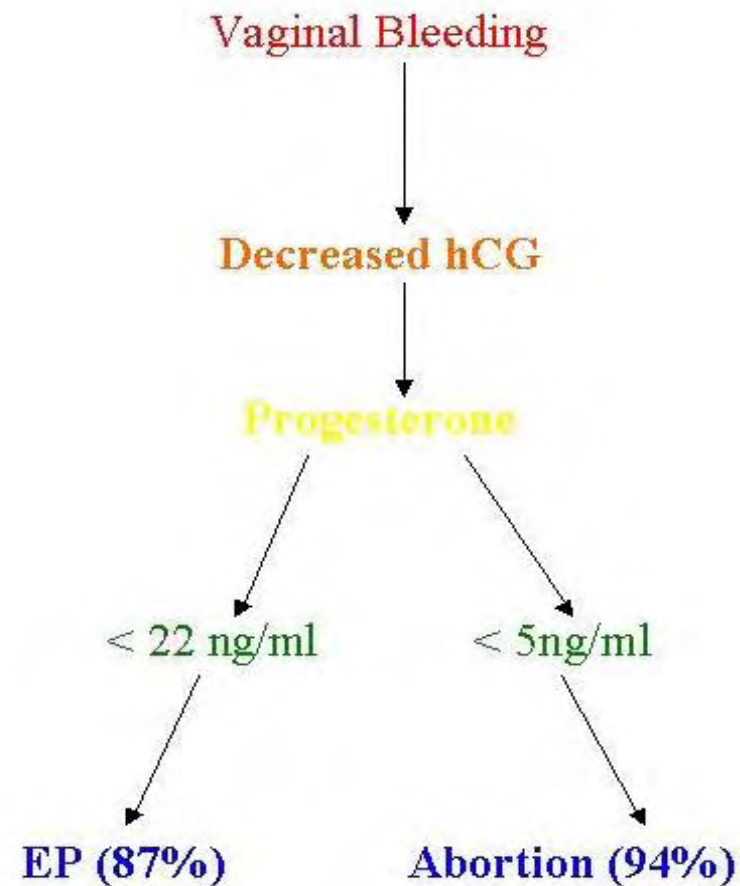
- DEFINITION
- In this complication, **fertilized ovum is implanted and developed on other tissues of reproductive system than the uterine wall.**
- In **ectopic pregnancy, the fetus develops in the tissues of fallopian tube, cervix, ovaries, and abdomen.**
- The ectopic pregnancies are mostly, about 98%, implanted in fallopian tube and are known as tubal pregnancies

What is an ectopic pregnancy?

- An **ectopic pregnancy** occurs when the fertilized egg (**ovum**) implants somewhere other than in the uterus.
- This is a serious condition needing immediate treatment.
- Women with ectopic pregnancies often have abdominal pain and uterine bleeding. Usually, **abnormally low levels of hCG are produced in ectopic pregnancies with slower-than-normal rates of increase.**

During a pregnancy with vaginal bleeding we should measure the hCG titer. If it decreased progesterone is measured as the second step.

Progesterone less than five means abortion and less than 22 is an ectopic pregnancy.



DIAGNOSIS Ectopic pregnancy,

- Ultrasound
- HCG
- Progesterone level

Testing EP

Beta > 6000 mIU/ml + empty uterus on trans *abdominal* ultrasound

OR

Beta > 1200 mIU/ml + empty uterus on trans *vaginal* ultrasound =

Ectopic Pregnancy = Laparoscopy

Beta <6000 + empty uterus on transabdominal ultrasound

OR

Beta < 1200 + empty uterus on transvaginal ultrasound = serial outpatient beta measurements to ensure normal rise.

This only applies to stable patients and should be done in consult with ob/gyn

PROGESTERONE

- Greater than 25ng/ml is predictive of a viable IUP
- Less than 5ng/ml is 100% sensitive of a nonviable gestation.
 - Does not distinguish IUP from ectopic
- Levels of 5-25 no benefit
- Advantage is only one level needed

HCG

- **Doubling time is 1.5 days initially but increases to 3.5 days at 7 weeks.**
- **Peaks at 8-10 weeks 100,000**
- **Levels double in 2/3 of normal pregnancies in 2 days**
- **A failure to rise 66% by 48hrs is abnormal (15% of normal IUP's will do)**

HCG

- **A gestational sac can be seen on vaginal US at 1500**
- **A gestational sac can be seen on abdominal US at 6500**
- **Need serial tests**

DIAGNOSIS

- Limitations of serial HCG levels- can not discriminate between abnormal IUP or ectopic
- Definitive diagnosis is established by gestational sac plus yolk sac or fetal heart motion

ESTABLISHING DIAGNOSIS

- **Combination of US and HCG**
- **HCG levels may rise, plateau, or fall**
- **Level of 1500 plus TV US should show IUP**
- **Lower levels will need serial HCG, possible place for progesterone level**

What is gestational trophoblastic disease?

- Gestational trophoblastic disease (GTD) refers to a group of diseases that can affect a woman's uterus, from benign tumors to malignant choriocarcinoma. Molar pregnancy is one type of GTD.
- The tumors start in the layer of cells called the trophoblast that becomes the placenta in a normal pregnancy.
- Blood hCG level testing can help to diagnose and monitor GTD. With appropriate treatment, the cure rate for GTD is very high. For more information, see the [American Cancer Society: What is gestational trophoblastic disease?](#)

Different kinds of trophoblastic diseases.

Clinical Spectrum of Gestational Trophoblastic Neoplasia

Benign

Hydatidiform mole—complete

Hydatidiform mole—partial or transitional

Hydropic degeneration of villi in blighted ovum

Malignant

Nonmetastatic

Persistent hydatidiform mole

Chorioadenoma destruens (invasive mole)

Choriocarcinoma

Metastatic

Good prognosis

Poor prognosis

Pretreatment serum hCG >40,000 mIU/mL

Duration of symptoms >4 mo

Liver or brain metastases

Significant prior unsuccessful chemotherapy

Prior term gestation

(Placental-site trophoblastic tumor)

*The prevalence of choriocarcinoma
and predisposing factors for it*

1 per 20000 to 40000 pregnancy will lead to choriocarcinoma

The predisposing factors for choriocarcinoma:

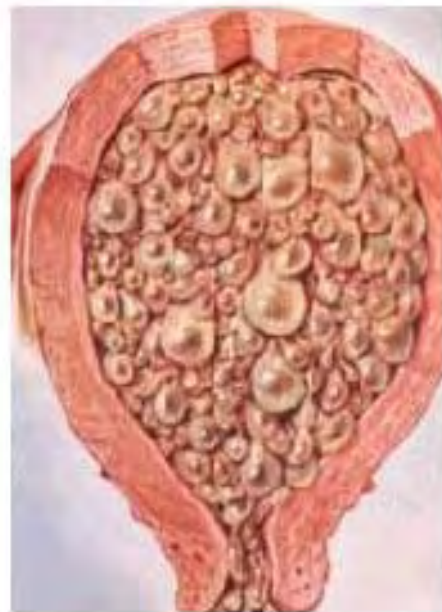
- 1 - Hydatidiform mole = 50%**
- 2 - Normal pregnancy = 25%**
- 3 - Abortion = 22%**
- 4 - Ep = 3%**

Diagnosis of Hydatidiform Mole

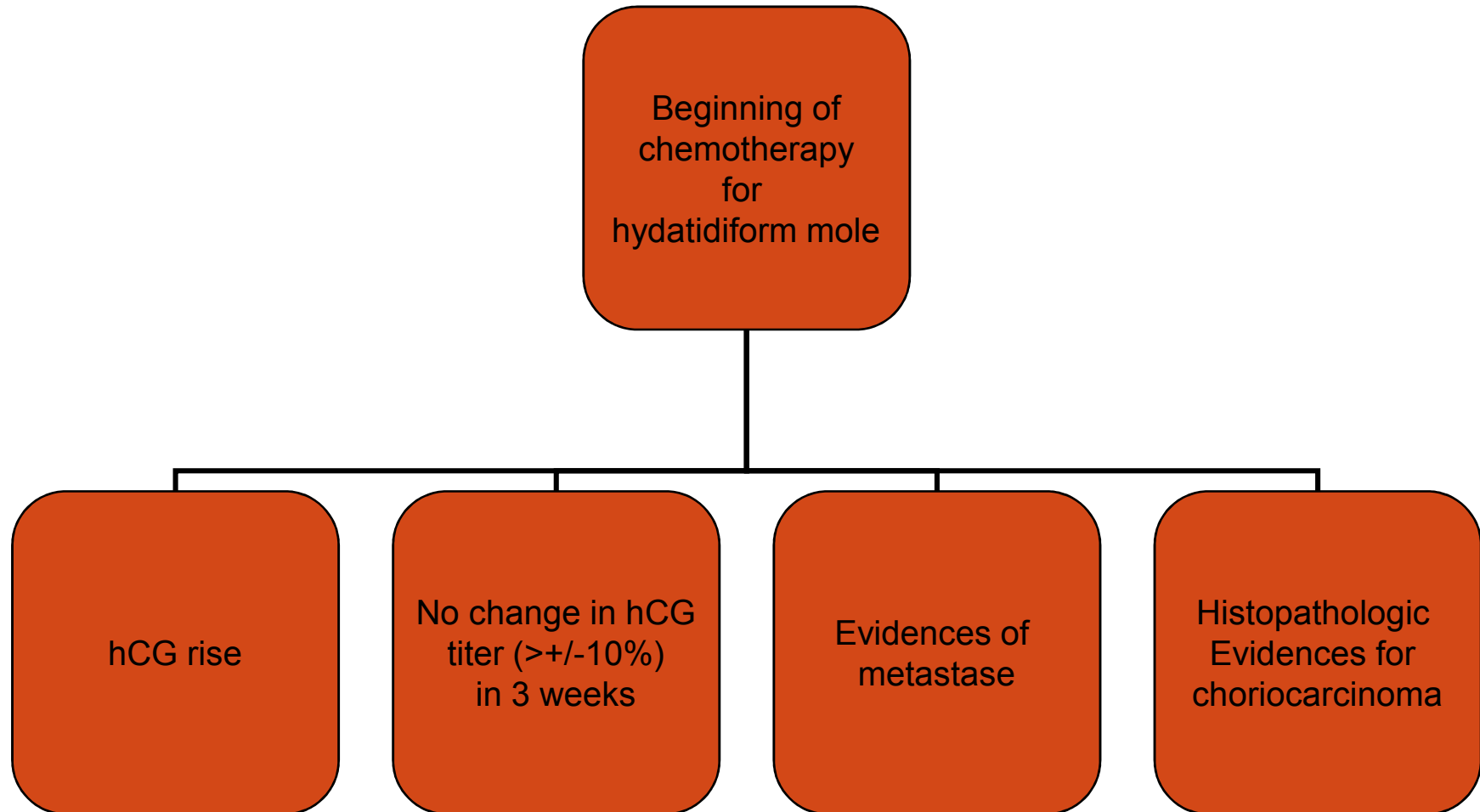
- **directly correlated with the serum levels of beta-hCG**
- The clinical diagnosis is made by:
- **an elevated serum beta-hCG**
- absence of fetal heart tones
- snowstorm pattern on ultrasound in the absence of a fetus

Clinical diagnosis of hydatidiform mole depends on the following symptoms and signs :

- 1 - vaginal bleeding**
- 2 - Uterine enlargement**
- 3 - Unilateral or bilateral enlargement of the ovaries**
- 4 - hCG more than 100/000**
- 5 - Premature preeclampsia**
- 6 - Increased thyroidal hormones**



The second step for treatment of hydatidiform mole is chemotherapy. hCG titer is very important for this decision.



*50% of the choriocarcinomas are secondary to normal or abnormal pregnancies. So **after ending any pregnancy we should control the titer of hCG to reach to zero.***

At the end of
non-molar pregnancies

The hCG titer is not checked

Potential choriocarcinomas will grow

Metastases occur in 75%

In every woman with a metastasis we should measure hCG titer.

- **- A choriocarcinoma may show itself 10 to 20 years after a pregnancy !.**
- **- After metastasizing to other organs, sometimes the primary choriocarcinoma disappears by itself !.**
- **So In every woman with a metastasis we should measure hCG titer.**

Serum HCG levels after non trophoblastic Abortions

- **Should fall to undetectable level by 3 weeks.**
- **Below 5mIU/ml - negative,**
- **Above 25mIU/ml -positive.**

HCG Levels after trophoblastic abortions

- **Greater than 500mIU/ml frequently by 3 weeks and usually by 6 weeks.**
- **HCG titer should fall to a non-detectable level by 15 weeks.**

HCG levels -Management

- **Indications of chemotherapy**
 - **Serum hCG > 20, 000 IU/L at >4 weeks.**
 - **Rising hCG. i.e. 2 consecutive rising serum samples.**
 - **hCG plateau. i.e. 3 consecutive serum samples not rising or falling significantly.**
 - **hCG still abnormal at 6 months post evacuation.**

Conclusion

- **Partial Mole is a common, but under-diagnosed gestational trophoblastic disease.**
- **combine use of serum HCG and ultrasonography in early pregnancy leads to suspicion of partial mole, and histology can confirm the diagnosis.**
- **Early diagnosis, and use of prophylactic chemotherapy if indicated can prevent the development of chorio-carcinoma**

Diagnostic Implications of Serum HCG levels

- **Single HCG value –Not very informative**
- **rate of increase in HCG levels varies as a pregnancy progresses .**
- **Normal HCG values vary up to 20 times between different pregnancies,**
- **An HCG that does not double every two to three days does not necessarily indicate a problem with the pregnancy.**
- **Some normal pregnancies will have quite low levels of HCG, and result in perfect babies.**

Correlation between HCG level, and sonography findings

- **Serum HCG levels 1800 IU/L- Gestational sac should be visible by USG**
- **Serum HCG levels 5000IU/L-Cardiac pulsation should be visible.**
- **More than 5000 IU/L rules out Ectopic pregnancy.**



نقش آزمایشگاه بالینی در روش های غربالگری سرمی در حوزه ارزیابی سلامت جنین

تهیه و تنظیم : دکتر مهرداد ونکی
مدرس و مشاور حوزه مدیریت کیفیت آزمایشگاه ها









REFERENCES

- 1. Taheri Amin MM, et al. Gamete Scientific Bulletin. Vol 2, No.5 Summer 2004.
- 2. Evans Ml, et , al , Prenatal Diagnosis. McGraw Hill 2006 ; pp : 277-85.
- 3- COUNINGHAW FG, et al. Williams Obstetrics. McGraw Hill 2005;pp:318-30
- 4- HADDOW JE, et al. New Engl.J.Med. 1994; 330(16): 1114-18.
- 5- SMITH-BINDMAN, et al. JAMA 2001;288(8): 1044-55.
- 6- ACOG Practice Bulletin. Obstet. Gynecol. May 2001;97(5): suppl 1-12.
- 7- MARTEAU TM, et al. Prenat. Diag. 2000;20: 714-18.
- 8- NCCLS guideline for Down's Syndrome Screening Tests,2004.

• منابع فارسی

- تشخیص و پیگیری بالینی بیماریها به کمک روشهای آزمایشگاهی ، بیوشیمی بالینی هنری دیویدسون با مقدمه و تحت نظارت مستقیم دکتر محمد درخشان (۲۰۰۷)
- پنتامارکر (پنتاسکرین) ، جدیدترین پروتکل غربالگری سندرم داون ، نویسنده : دکتر مهدی طاهری امین

تعريف غربالگري screening

غربالگري روشي است كه مي تواند افراد به ظاهر سالم را كه كه به لحاظ يك
بيماري يا اختلال داراي ريسك بالائي مي باشند شناسائي نموده
تست هاي غربالگري قادر است احتمال بوجود آمدن يك بعيماري يا وضعيت
خاص را کاهش دهد ولي تضميني براي عدم بروز آن نمي باشد

به اين معني كه نتايج منفي تست هاي غربالگري منفي
قطعي نمي باشد و نتايج مثبت آن نيز نتايج مثبت
قطعي نمي باشد

ویژگی های اصلی یک تست غربالگری

۱- تست غربالگری بایستی دارای ویژگی بالا و موارد مثبت کاذب پائین باشد

۲- تست تائیدی نهایی در کنار هر تست غربالگری مورد نیاز است

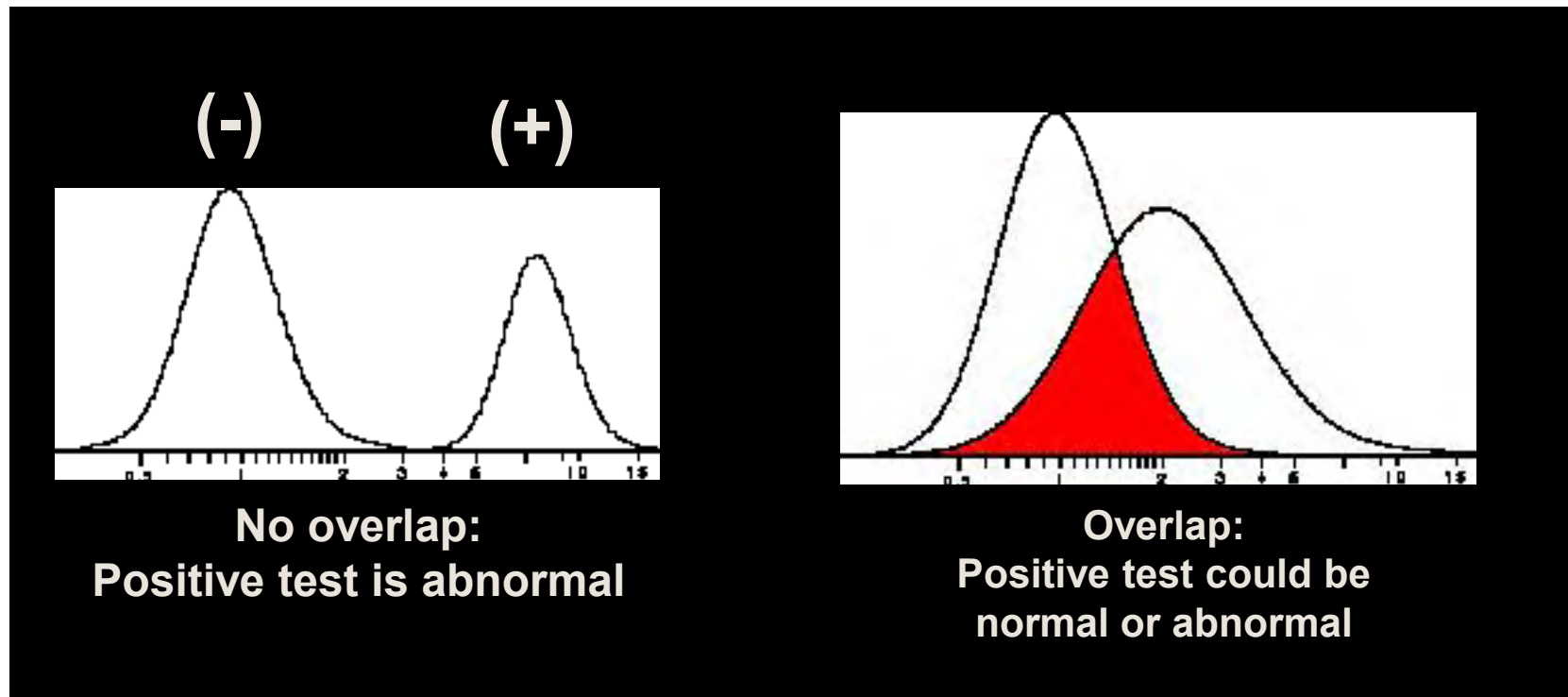
۳- تست غربالگری بایستی ساده و کم هزینه و کم خطر باشد تا بتوان آن را بر روی تمام افراد جمعیت به کار برد

۴- تست غربالگری و تائیدی نهایی در نهایت بایستی اثر بخش و کارآمد جهت ارتقا سلامت جامعه باشد

Essential Elements of Screening

- **It is NOT diagnostic!**
- **Screen positive rates and PPV depend on *a priori* population risk and the desired detection rate (sensitivity)**
- **An acceptable diagnostic test or procedure must be available for screen-positives**
- **Should be cost effective and low risk**
- **A treatment must be available for true positives**

Diagnostic versus Screening



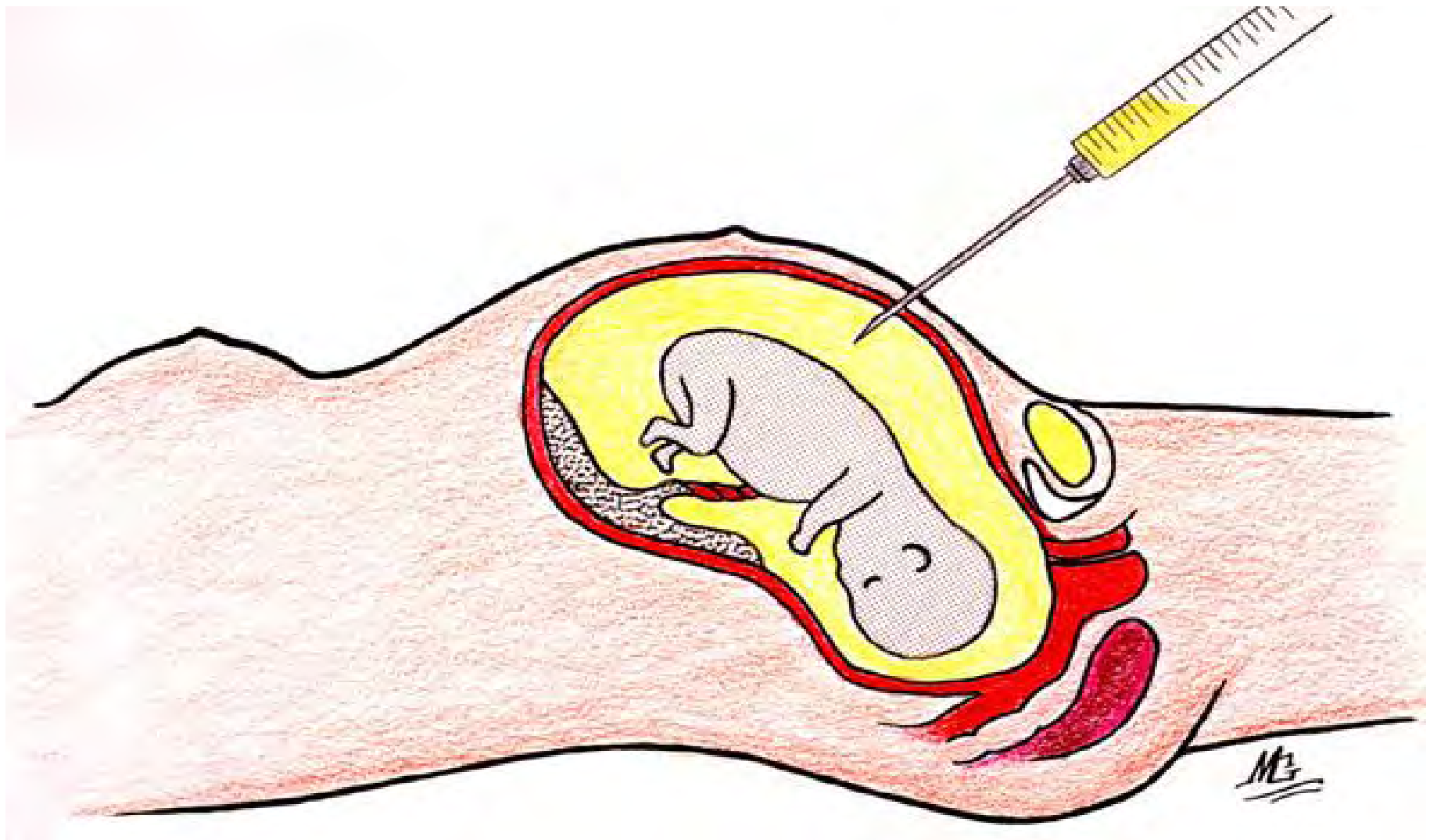
Prenatal Testing

- General Testing
 - Blood Test
 - Paternity Testing
 - Urine Test
 - Ultrasound
 - Rh Factor Testing
- First Trimester
 - Chorionic Villus Sampling (CVS)
 - First Trimester Screen
- Second Trimester
 - Amniocentesis
 - Cordocentesis : Percutaneous Umbilical Blood Sampling (PUBS)
 - Maternal Serum Alpha-Fetoprotein Screening (MSAFP)
 - Quad Screen
 - Triple Screen Test : Multiple Marker Screen
- Third Trimester
 - Biophysical Profile (BPP)
 - Fetal Non-Stress Test (NST)
 - Glucose Challenge Screening & Glucose Tolerance Test (NST)
 - Group B Strep Infection

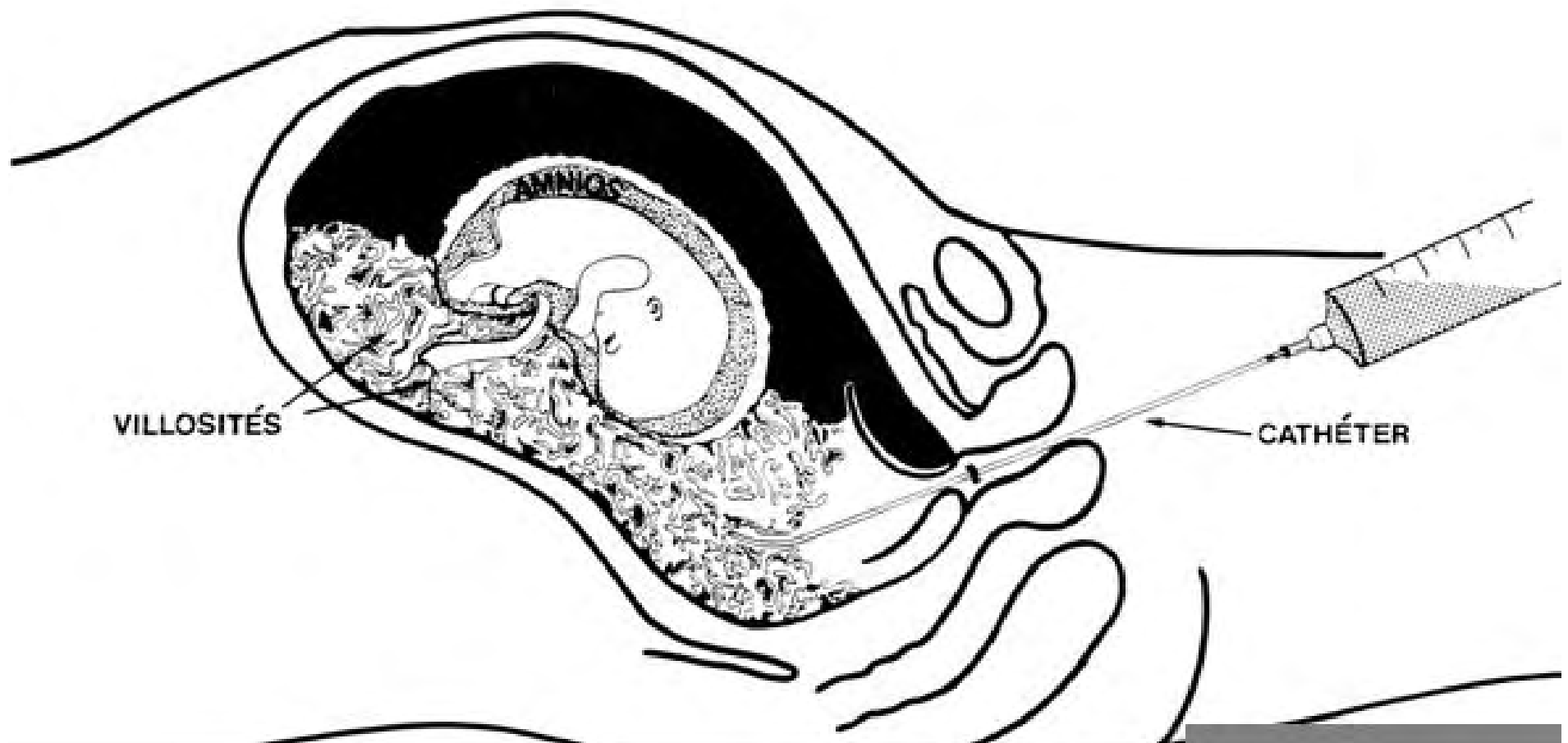
تاریخچه آزمون های ارزیابی سلامت جنین

مقدمه : تا سال ۱۹۷۰ میلادی تنها روش تشخیص ناهنجاری های کروموزومی در جنین مادران باردار با ریسک (خطر) بالا (سن بالا ۳۵ سال / دارای سابقه فرزند با اختلال ژنتیکی و..) استفاده از روش های تهاجمی نظیر آمنیوسنتزیس و نمونه برداری از پرزهای جفت بوده است که با توجه به خطر بالای سقط جنین در این گروه از روش های تهاجمی (حدود ۳ الی ۵ درصد) محدودیت جدی برای این گروه روش ها حاصل نموده و انجام این روش های تهاجمی صرفاً برای جامعه زنان باردار با ریسک بالا قابل توصیه می باشد و با توسعه تست های غربالگری سرمی جهت مادران باردار که تست هائی با هزینه کمتر و کم خطر می باشند امکان غربال گروه های کم خطر و پرخطر در جامعه زنان باردار فراهم گردیده است که تاکنون به لحاظ کمی و کیفی پیشرفت های قابل ملاحظه ای داشته اند .

amniocentesis procedure



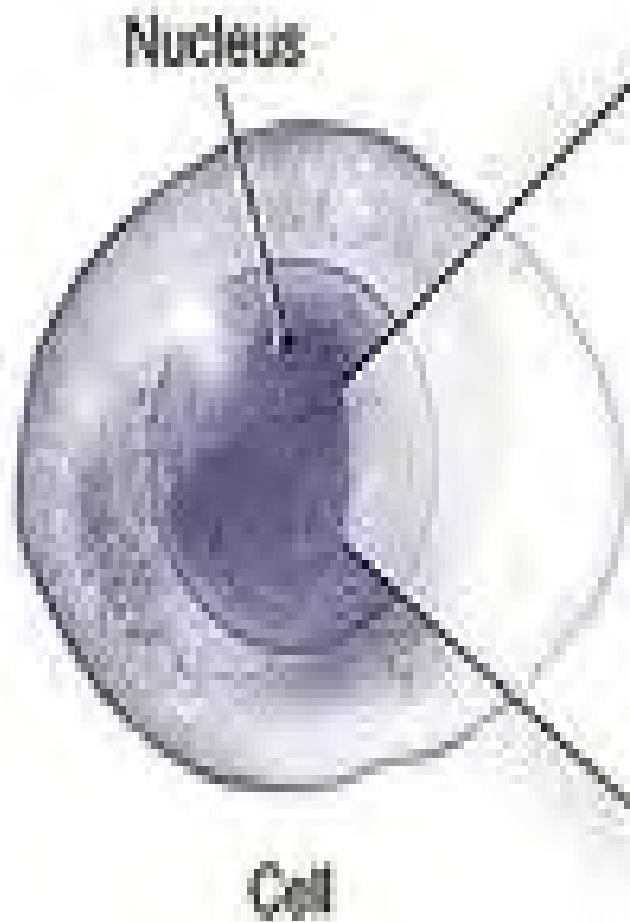
Chorionic villus sampling procedure



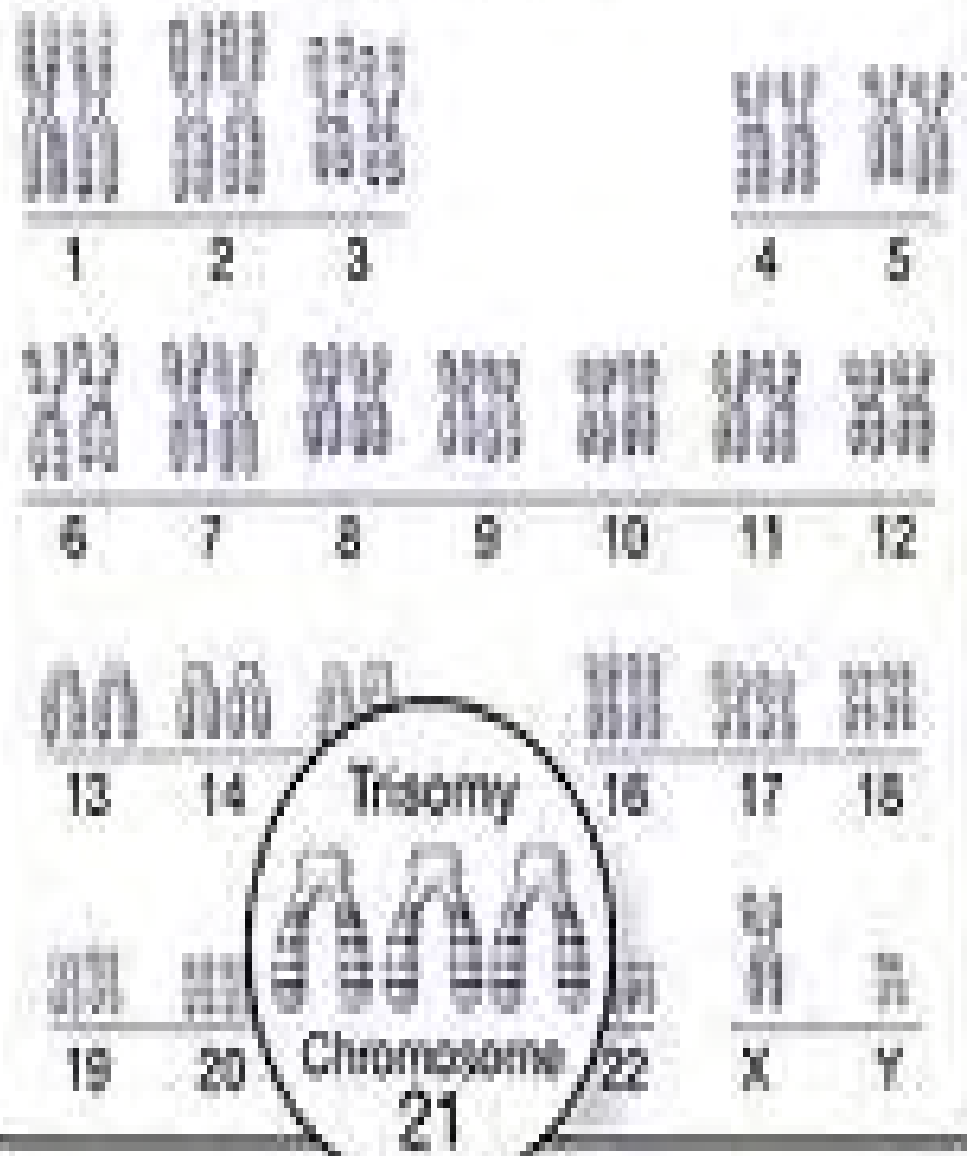
«Chorionic Villus sampling» CVS نمونه برداری از پرزهای جنینی

- **نمونه برداری از پرزهای جنینی در حدود هفته های ۱۴-۱۱ بارداری انجام می پذیرد** ، با استفاده از اولتراسوند و بی حسی موضعی ، نمونه از بافت جنینی یا بوسیله سوزنی که از دیواره شکمی عبور می نماید و یا انبر جراحی که از گردن رحم عبور می کند ، گرفته می شود ، احتمال کمی در حدود ۱% وجود داشته که این روش موفق نبوده و نتیجه قطعی بدست نیاید . که در این صورت بایستی آمینوسنتز انجام گیرد .

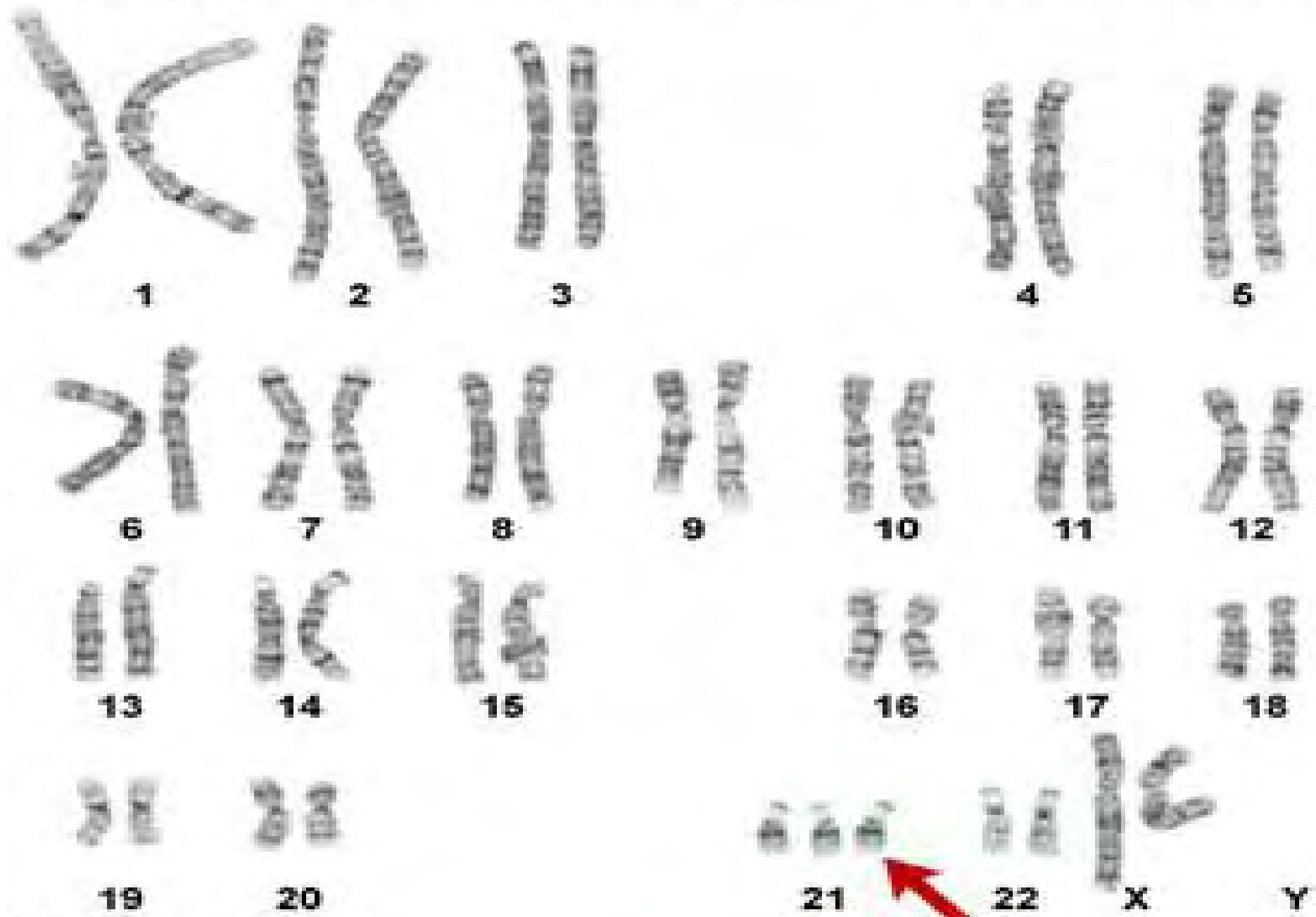
- **آمینوسنتز بایستی در حدود هفته های ۱۶-۱۵ بارداری انجام پذیرد** . با استفاده از اولتراسوند ، نمونه گیری از مایع جنینی بوسیله سوزنی که وارد دیواره شکمی می شود ، انجام گرفته و سلولهای نمونه برای تشخیص سندرم داون به کار می روند . احتمال عدم موفقیت در اخذ نتیجه مشابه CVS بوده و حدود ۱% است . سندرم داون ، تریزومی ۱۸ و تریزومی ۱۳ و نیز کروموزوم های جنینی را می توان با استفاده از تکنیک تلفیقی واکنش زنجیره ای پلیمر از _ فلئورسانس (QF-PCR) تشخیص داد که در این صورت تشخیص سریعتر و در طی ۴۸ ساعت میسر خواهد شد ، در حالیکه در روشهای دیگر ابتدا بایستی سلولها قبل از آزمایش رشد یافته و لذا نتایج نهایی ۱۰ روز پس از انجام CVS و ۲-۳ هفته پس از آمینوسنتز آماده خواهند شد .



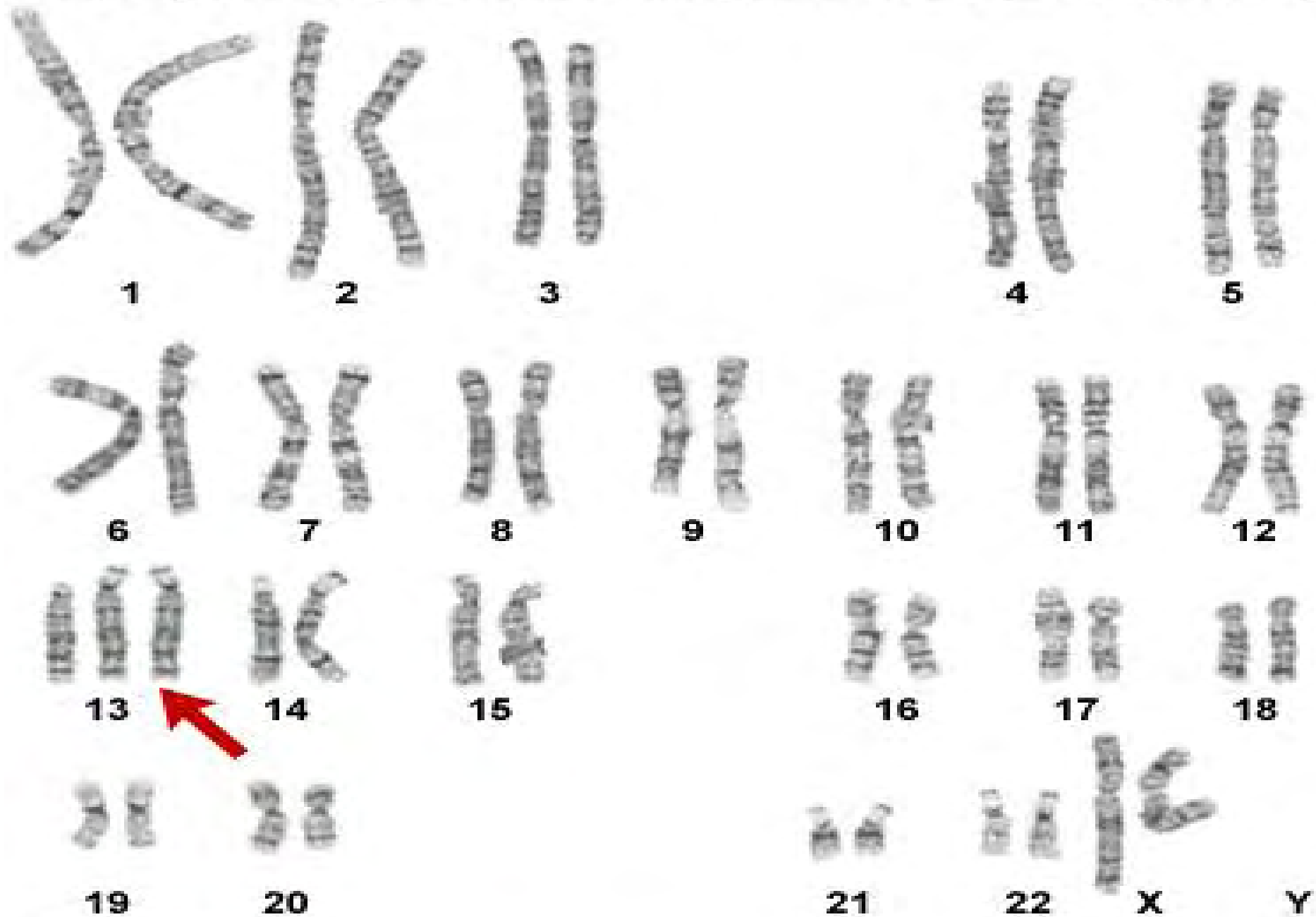
Chromosomes



Karyotype from a female with Down syndrome (47,XX,+21)



Karyotype From a Female With Patau syndrome (47,XX,+13)



Aneuploidies

Frequency

Frequency	Syndrome	Karyotype
<u>1:800</u>	<u>Down's</u>	<u>Trisomy 21</u>
1:7500	Edward's	Trisomy 18
1:5000	Patau	Trisomy 13
1:1000	Klinefelter	47, XXY
1:7500	Turner	46, X
1:700	Total Aneuploidies	
1:400	Structural Abnormalities	
6:1000	Total Abnormalities	

سندرم ادوارد یا ترایزومی ۱۸ چیست ؟

- سندرم ادوارد (ترایزومی ۱۸) نادر بوده لذا در صورت عدم غربالگری ، در حدود **یکی از هفت هزار نوزاد** متولد شده مبتلا به سندرم ادوارد به دنیا خواهد آمد .
- ترایزومی ۱۸ یا سندرم ادواردز ناهنجاری کشنده ای است که از حضور یک کروموزوم اضافی در کروموزوم شماره ۱۸ سلولهای در حال توسعه جنین ناشی می شود ؛
- در ترایزومی ۱۸ کاهش هر سه مارکر تریپل مارکر مشهود است .
- ترشولد ها یا مدین ها شامل: مدین کمتر از ۰.۶ جهت آلفا فتوپروتئین / مدین کمتر از ۰.۵۵ برای بتا ساب یونیت / مدین کمتر از ۰.۵ برای استریول آزاد
- عوامل تداخل دهنده و عامل بروز مثبت کاذب در غربالگری ترایزومی ۱۸ : بالا بودن وزن بیمار و دیابت وابسته به انسولین منجر به کاهش کاذب بتا و استریول آزاد می گردد

نقایص لوله عصبی چیست ؟

Neural Tube Defects (NTDs)

- **نقص لوله عصبی (NTDs) شایع ترین ناهنجاری های شدید مادرزادی است .** این اختلالات زمانی رخ می دهند که صفحه عصبی و پوشش های آنها برای اتصال صحیح به یکدیگر در حدود ۲۷ روز پس از بارداری دچار نقص شده باشند . **انسفالی ، اسپینا بیفیدا ، شایع ترین اختلالاتی هستند که در این بیماری تظاهر می یابند .** سابقه خانوادگی خطر عود این اختلالات را افزایش می دهد ، برای مثال زمانی که یک زوج یک فرزند با NTD داشته باشند ، در بارداری های بعدی خطر برای هر نوع از NTD تقریباً % ۱-۳ افزایش خواهد یافت .
- **غربالگری NTD شامل اندازه گیری غلظت آلفا فتوپروتئین سرم در خون مادر می باشد (MSAFP)**
غلظت آلفا فتوپروتئین در سرم جنین در هفته های ۱۲-۱۴ به حداکثر مقدار خود رسیده (3 mg/dl) و بعد از آن و در طی روزهای باقیمانده از بارداری کاهش می یابد . آلفا فتوپروتئین از میان غشاهای آمینوتیک گذشته و در مایع آمینوتیک (AF) غلظتی ایجاد می کند که حدود ۱۰۰ بار کمتر از غلظت سرمی جنین می باشد . حداکثر مقدار آلفا فتوپروتئین مایع آمینوتیک (AFAFP) در هفته های ۱۳-۱۴ بارداری می باشد . و سپس در سه ماهه دوم در حدود % ۱۰ در هر هفته کاهش می یابد ، میزان کمی از آلفا فتوپروتئین از طریق جفت از سرم جنینی به خون مادر منتقل شده و نیز مقداری کم از آلفا پروتئین از طریق آمینوتیک از AF به سرم مادری (MS) منتقل می شود ، جایی که غلظت آلفا فتوپروتئین ، ۱۰۰۰ بار کمتر از مقدار آن در مایع آمینوتیک است .
- **غربالگری NTDs بر اساس مقایسه سطوح AFP سرمی زن باردار در سه ماهه دوم بارداری با مقدار میانگین AFP سرم زنی با جنین طبیعی در سنین بارداری قابل مقایسه ، بنا نهاده شده است .**

SLOS (Smith Iemi Opitz Syndrome)

اختلال اتوزومال مغلوب متابولیسم کلسترول همراه با عقب ماندگی ذهنی

شیوع ۱ به ۶۰۰۰۰ دارد

۱- تشخیص بعد از تولد:

پائین بودن غلظت کلسترول خون

۲- تشخیص قبل از تولد :

الف) بالا بودن غلظت ۷-دهیدرو کلسترول در مایع آمنیوتیک

ب) در بارداری که جنین مبتلا به اختلال فوق است سطح سرمی هر

سه مارکرتریپل پائین است

ارزش تشخیصی تریپل در این اختلال کلسترول ۶۲٪ و مثبت

کاذب آن ۳.۳٪ است



تاریخچه سندرم داون

سندرم داون برای اولین بار توسط جان داون در سال ۱۸۸۶ گزارش شد و نام بیماری نیز به نام این پزشک ثبت گردید

سندرم داون یا ترایزومی ۲۱ (سه تایی شدن کروموزوم ۲۱) شایع ترین اختلال کروموزومی در انسان می باشد که دارای شیوع ۱ به ۸۰۰ می باشد

بیشترین کاربرد تست غربالگری سندرم داون در خانم های بالای ۳۵ سال می باشد که با انجام این تست های غربالگری حداقل ۳۰٪ موارد سندرم داون در سنین بالا آشکار گردیده لذا ضرورت انجام تست تهاجمی و پرهزینه آمنیوسنتز که تست قطعی تشخیصی می باشد جهت گروه های کم خطر در حوزه غربال شده کاهش می یابد

سن مناسب برای غربالگری سندرم داون

با استفاده از این تست ها مادران در معرض ریسک بالا شناسایی و برای انجام تست های تشخیصی معرفی می گردند.

از آنجا که موارد متعددی از سندرم داون در مادران زیر ۳۵ سال بروز می کند ، **کالچ متخصصان زنان و زایمان آمریکا (ACOG) اکیداً توصیه می کند که تست های غربالگری سندرم داون برای تمام مادران باردار انجام شود.**

امروزه رایج ترین تست غربالگری سندرم داون که در بسیاری از کشورهای دنیا به صورت ملی بر روی تمامی مادران باردار انجام می پذیرد ، **تست کوآد مارکر است. این تست دارای نرخ تشخیص حدود ۸۰ - ۷۵٪ است (نرخ مثبت کاذب برابر ۵٪) که نسبت به نرخ تشخیص تست تریپل مارکر (۷۰ - ۶۵٪) ، ۱۰٪ بیشتر است.**

سازمان بهداشت و درمان ملی کشور کانادا از سال ۲۰۰۷ کاربرد تست های غربالگری که نرخ تشخیص کمتر از ۷۵٪ دارند را ممنوع اعلام نمود و اجازه کاربرد در تشخیص های بالینی را ندارند

سن مناسب برای غربالگری سندرم داون

عامل موثر دیگر بر ریسک ابتلا به سندرم داون ، سن مادر می باشد که یک ریسک پیش زمینه می باشد . برای محاسبه نتیجه غربالی خانمی که مارکر های غربالگری او اندازه گیری شده به کار می رود ، همان طور که در جدول زیر آمده است ، هر چه سن مادر بالاتر باشد ریسک ابتلا به سندرم داون بیشتر خواهد شد .

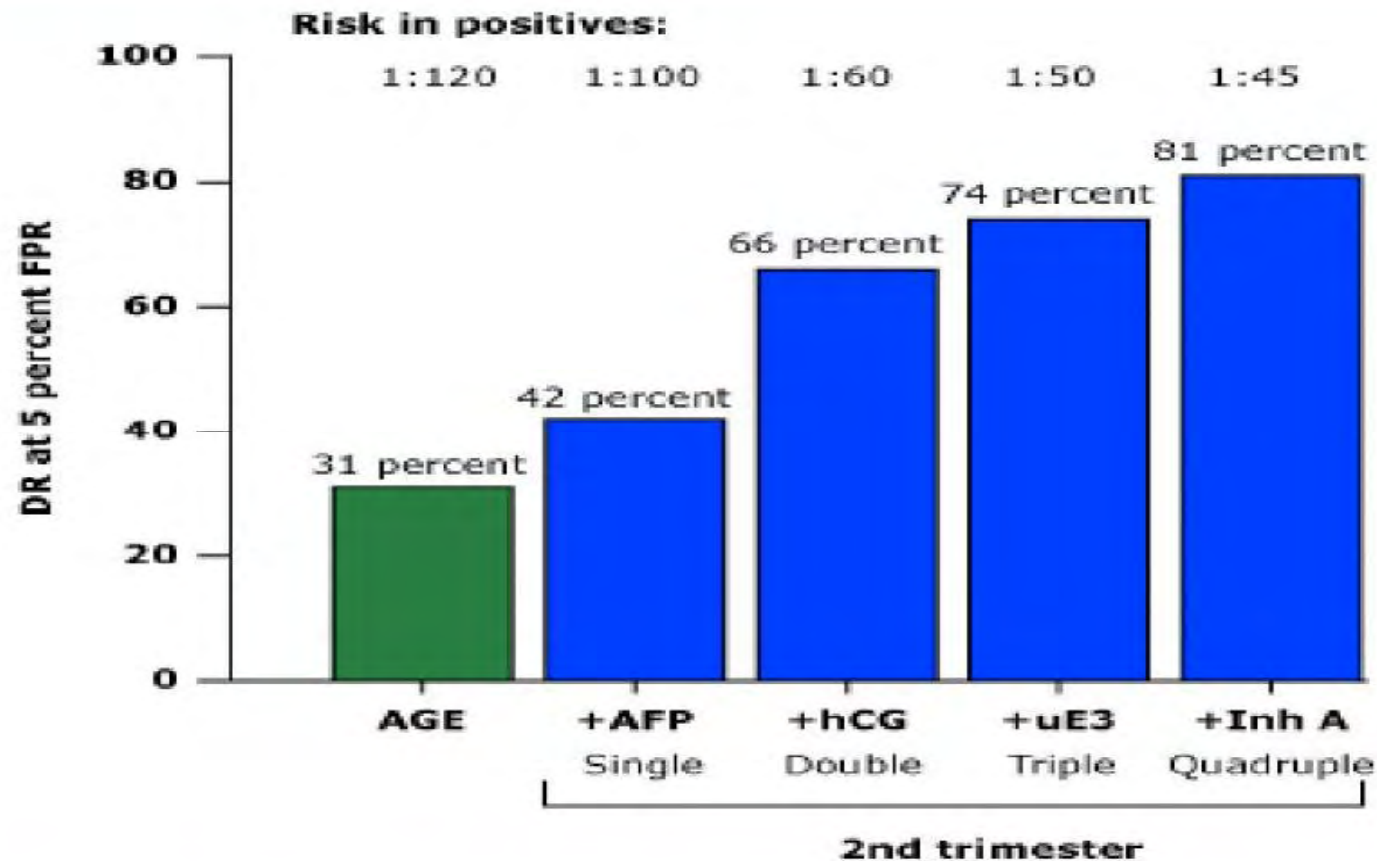
نکته مهمی که بایستی در رابطه با سن مادر و آزمون های غربالگری باید در نظر داشت این است که با وجودی که سن مادر ، در هنگام بارداری ارتباط مستقیمی با احتمال ابتلا به جنین با سندرم داون دارد ، **اما بیش از ۸۰٪ نوزادان مبتلا به سندرم داون از مادران زیر ۳۵ سال به دنیا می آیند .**

این نکته از آن جهت حائز اهمیت است که برای **تشخیص قبل از تولد سندرم داون نمی توان صرفاً بر خانم های بالای ۳۵ سال تمرکز نمود بلکه بایستی روشهای غربالگری برای کلیه خانمهای باردار انجام پذیرد .**

سن مناسب برای غربالگری سندرم داون

سن مادر	ریسک سندروم داون	سن مادر	ریسک سندروم داون	سن مادر	ریسک سندروم داون
۲۰	۱:۱۴۵۰	۳۰	۱:۹۴۰	۴۰	۱:۸۵
۲۱	۱:۱۴۵۰	۳۱	۱:۸۲۰	۴۱	۱:۷۰
۲۲	۱:۱۴۵۰	۳۲	۱:۷۰۰	۴۲	۱:۵۵
۲۳	۱:۱۴۰۰	۳۳	۱:۵۷۰	۴۳	۱:۴۵
۲۴	۱:۱۴۰۰	۳۴	۱:۴۶۰	۴۴	۱:۴۰
۲۵	۱:۱۳۵۰	۳۵	۱:۳۵۰	۴۵	۱:۳۵
۲۶	۱:۱۳۵۰	۳۶	۱:۲۷۰	۴۶	۱:۳۰
۲۷	۱:۱۲۰۰	۳۷	۱:۲۰۰	۴۷	۱:۳۰
۲۸	۱:۱۱۵۰	۳۸	۱:۱۵۰	۴۸	۱:۳۰
۲۹	۱:۱۰۵۰	۳۹	۱:۱۱۰	۴۹	۱:۲۵

Performance of maternal age and various second trimester maternal serum combinations in screening for Down syndrome



The bar graphs describe the detection rate (DR) attained at a fixed 5 percent false positive rate (FPR) for each of the screening tests. In addition, the risk in positives is given for each of the tests. *Data adapted from: Wald, NJ, Kennard, A, Hackshaw, A, et al. J Med Screen 1997; 4:181.*



خیابان کارون ، تقاطع امام خمینی
(سپه غربی) ساختمان ۱۰۲۶
تلفن: ۶۶۳۶۷۹۱۴ - ۶۶۳۷۳۸۹۰
تلفکس: ۶۶۸۳۷۱۶۷
تلفن گویا: ۶۶۳۵۷۹۲۳ (جواب دهی)

www.farvardin-lab.com Email: info@farvardin-lab.com



آزمایشگاه پاتوبیولوژی فروردین
پر ۳۵ ازمایشگاه های تخصصی لوح تهران
Farvardin Pathology Lab

DOWN'S SYNDROME, NEURAL TUBE DEFECT AND PRE-ECLAMPSIA SCREENING

Report dated May 09 11

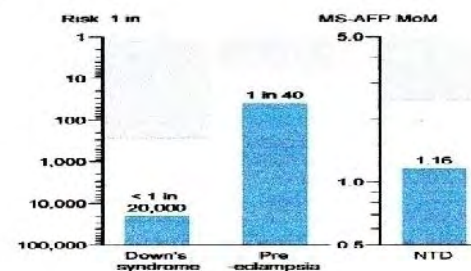
Surname : NAZAR POR
Forename(s) : Talat
ID code : A 2- 2537
Date of birth : 07/06/80
LMP : Not reported
EDD : 10/03/11
Date of sample : 05/04/11
Doctor : Dr . Motamedi

CLINICAL DETAILS AND TEST RESULTS

Previous NTD : None
Previous Down's : None
Prev. Pre-eclampsia : No
Insulin dependent diabetes : None
Maternal age at EDD : 31 years
Scan measure : Not known
Gestation at date of sample : 18 weeks 2 days (by scan)
Weight : 62 kg
MS-AFP level : 43.99 iu/mL ; 1.16 MoM
uE3 level : 3.6 ng/mL ; 1.03 MoM
Total hCG level : 10537 mIU/mL ; 0.40 MoM

INTERPRETATION

Screening result : Screen negative
Risk of Down's : Less than 1 in 20,000 (at term)
Risk of NTD : 1 in 6,700
Risk of Pre-eclampsia : 1 in 40
Comment : Down's risk due to maternal age alone is
1 in 850



TRISOMY 18 : NEGATIVE
SLOS : NEGATIVE

A screen negative result does not exclude the possibility of Down's syndrome, a neural tube defect or pre-eclampsia, because screening does not detect all affected pregnancies

This is an Alpha report

DOWN'S SYNDROME, NEURAL TUBE DEFECT AND PRE-ECLAMPSIA SCREENING

Report dated Apr 14 11

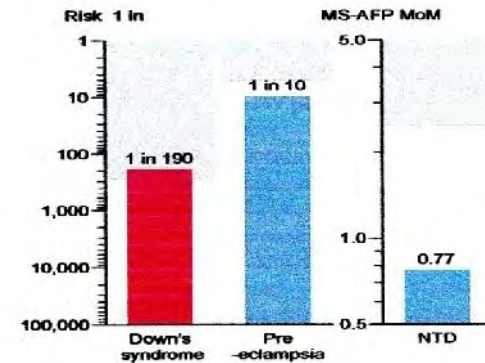
Surname : MIRANI
Forename(s) : Zahra
ID code : 1-1233
Date of birth : 09/01/79
LMP : 12/20/10
EDD : 09/29/11
Date of sample : 04/07/11
Doctor : Dr . Gods

CLINICAL DETAILS AND TEST RESULTS

Previous NTD : None
Previous Down's : None
Prev. Pre-eclampsia : No
Insulin dependent diabetes : None
Maternal age at EDD : 32 years
Scan measure : Not known
Gestation at date of sample : 15 weeks 3 days (by dates)
15 weeks 0 days (by scan)
Gestation used : Scan estimate
Weight : 67 kg
MS-AFP level : 18.45 iu/mL ; 0.77 MoM
uE3 level : 0.8 ng/mL ; 0.46 MoM
Total hCG level : 58462 miu/mL ; 1.05 MoM

INTERPRETATION

Screening result : ***** SCREEN POSITIVE *****
Reason : **Increased risk of Down's syndrome**
Risk of Down's : **1 in 190 (at term)**
Risk of NTD : **1 in 5,400**
Risk of Pre-eclampsia : **1 in 10**
Comment : **Down's risk due to maternal age alone is 1 in 750**



TRISOMY 18 : NEGATIVE
SLOS : NEGATIVE

A screen positive result indicates an increased risk of having a pregnancy with Down's syndrome, a neural



www.farvardin-lab.com Email: info@farvardin-lab.com

خیابان کارون ، تقاطع امام خمینی
(سپه غربی) ساختمان ۱۰۲۶
تلفن: ۶۶۳۶۷۹۱۴ - ۶۶۳۷۳۸۹۰
تلفکس: ۶۶۸۳۷۱۶۷
تلفن گویا: ۶۶۳۵۷۹۲۳ (جواب دهی)

آزمایشگاه پاتوبیولوژی فروردین
دارنده اولین گواهینامه لوح کیفیت استاندارد
در سطح آزمایشگاه های پزشکی استان تهران



آزمایشگاه پاتوبیولوژی فروردین
مرکز آزمایشات فوق تخصصی غرب تهران
Farvardin Pathobiology Lab

DOWN'S SYNDROME, NEURAL TUBE DEFECT AND PRE-ECLAMPSIA SCREENING

Report dated May 09 11

Surname : HASAN LO
Forename(s) : Foziyeh
ID code : A 2-2534
Date of birth : 02/03/85
LMP : 01/22/11
EDD : 10/17/11
Date of sample : 05/04/11
Doctor : Dr . Jafar Zade

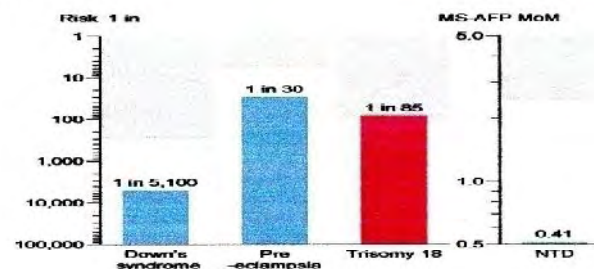
CLINICAL DETAILS AND TEST RESULTS

Previous NTD : None
Previous Down's : None
Prev. Pre-eclampsia : No
Insulin dependent diabetes : None
Maternal age at EDD : 26 years
Scan measure : Not known
Gestation at date of sample : 14 weeks 4 days (by dates)
16 weeks 2 days (by scan)
Gestation used : Scan estimate
Weight : 60 kg
MS-AFP level : 12.04 iu/mL : 0.41 MoM
uE3 level : 1 ng/mL : 0.43 MoM
Total hCG level : 15792 miu/mL : 0.41 MoM

INTERPRETATION

Screening result : Screen negative
Risk of Down's : 1 in 5,100 (at term)
Risk of NTD : 1 in 7,000
Risk of Pre-eclampsia : 1 in 30
Comment : Down's risk due to maternal age alone is 1 in 1,300
*** Increased risk of trisomy 18
*** (1 in 85 at term)

Comment



SLOS : NEGATIVE

A screen negative result does not exclude the possibility of Down's syndrome, a neural tube defect or pre-eclampsia, because screening does not detect all affected pregnancies

This is an Alpha report

تغییرات مارکرهای ۳ ماهه دوم در اختلالات مختلف

	Frist trimester	Frist and second trimester combind		Second Trimester			
Screening Protocol	Frist trimester Combind screen	Frist intrgrated screen	Intergrated screen	Sequential screen	Triple screen	Quarsruple screen	Panta screen
Downs syndrome detaction Rate	۸۵%	۸۵%	۹۲%	(۹۷%)۹۴%	۶۴%	۷۷%	۸۴%
False positive (FPR) Rate	۵%	۵%	۵%	۵%	۵%	۵%	۵%

نرخ تشخیص در پروتکل غربالگری

پروتکل غربالگری

نرخ تشخیص

سن و AFP

۴۲%

سن و hcG,AFP-

۶۰%

سن و hcG,AFP- و UE_3 و (Triple screen)

۶۷%

سن و hcG,AFP- و UE_3 ، inhibin A (Quad screen)

۷۷%

سن و hcG,AFP- و UE_3 ، inhibin A, ITA (panta screen)

۸۴%

در چه مواردی تکرار تست غربالگری الزامی و ضروری است

در صورتی که ریسک مادر بیش از ۱:۲۵۰ باشد لازم است تا سن بارداری مادر مجدداً تأیید شود بدین معنی که برای تعیین دقیق سن جنین با انجام یک سونوگرافی دیگر ، اطمینان حاصل شود.

اگر پس از سونوگرافی ، سن جنین کمتر از ۵ روز با سن پیشتر تعیین شده اختلاف داشته باشد ، همان ریسک قبلی مورد قضاوت قرار می گیرد.

در صورتی که سن جنین بیش از ۵ روز با سنی که ریسک براساس آن محاسبه شده اختلاف داشته باشد ، لازم است سن بارداری جدید به آزمایشگاه اطلاع داده شود تا نتایج با سن بارداری مجدداً مورد بررسی قرار گیرد و ریسک جدید مطالعه شود.

اگر ریسک جدید نرمال باشد ، بررسی بیشتر لازم نیست اما اگر ریسک همچنان بالا باشد انجام مشاوره ژنتیک و تست های تشخیصی به بیمار توصیه می گردد.

در چه مواردی تکرار تست غربالگری الزامی و ضروری است

اگر در سونوگرافی مشخص شود که بیمار زودتر از هفته ۱۴ بارداری مراجعه کرده است ، نتایج غیر قابل قبول بوده و بایستی نمونه مجدد پس از هفته ۱۴ بارداری گرفته شود و نتایج جدید مورد تفسیر قرار گیرد ؛ و اگر بیمار پس از ۲۲ هفتگی جنین مراجعه کرده باشد جواب تست غیر قابل قبول بوده و انجام تست کوآد مارکر برای این مادران بی حاصل است. در این موارد انجام سونوگرافی برای بررسی مارکرهای سونوگرافی سندرم داون پیشنهاد می گردد

پیگیری بیماران با ریسک بالا غربالگری

رعایت سه نکته مهم است :

- ۱- به دقت و صحت مطلوب نتایج مارکر های سرمی اطمینان کامل داشته باشیم
- ۲- مدین های بر اساس میانگین جمعیت محاسبه شده
- ۳- با درخواست تعیین مجدد سن جنین از طریق سونوگرافی دقیق تست غربالگری مجددا ارزیابی گردد و پس از تأیید مجدد جهت تست های قطعی و تهاجمی نظیر آمنیوسنتز معرفی شوند

Multiple of Median = Mom

مدین های خام اولیه از تقسیم میزان اندازه گیری شده مارکر به مدین جمعیت نرمال در سن بارداری (روز و هفته بارداری) بدست می آید و در نهایت این مدین های خام با فاکتور هائی نظیر وزن مادر و دیابت و بارداری دوقلو و لقاح مصنوعی و سابقه نتیجه مثبت و... تصحیح نهائی می گردد تا **مدین نهائی** بدست بیاید .

یکی از دلایل اختلاف نتایج تست های غربالگری در بین آزمایشگاه ها اختلاف گسترده بین مدین های آزمایشگاه ها می باشد خصوصا مراکزی که تازه شروع به غربالگری نموده اند و از مدین های جمعیت خارج از ایران که در نرم افزار موجود است استفاده می نمایند . پیشنهاد به این گروه از آزمایشگاه ها استفاده نمودن از مدین مراکز معتبر در داخل ایران می باشد که به میانگین واقعی جامعه ما نزدیک تر است

$$MoM = \frac{\text{Marker C}}{\text{Median C of normal Pregnancies of same GA}}$$

مدین شاخص های سرمی غربالگری و نحوه محاسبه

Multiples of Median (MOM)

منظور از مدین شاخص های سرمی محاسبه نسبت دو غلظت از یک مارکر سرمی می باشد که برای هر بیمار خاص خود آن بیمار می باشد.

به عبارتی مدین یک شاخص سرمی غربالگری از تقسیم مقدار غلظت شاخص سرمی بیمار بر مقدار غلظت میانگین آن شاخص در گروه زنان باردار نرمال (در حوزه جمعیتی آن منطقه جغرافیائی) در سن بارداری مشابه بدست می آید.

به عنوان مثال در ارتباط با آلفافتو پروتئین که در هفته های مختلف سه ماهه دوم بارداری دارای مقادیر مرجع متفاوتی می باشد مدین از تقسیم غلظت آلفافتو بیمار بر غلظت میانگین آلفافتو در مراجعین باردار نرمال در همان سن بارداری بدست می آید

مدین شاخص های سرمی غربالگری را می توان بر اساس پارامترهای جانبی و مهم تاثیرگذار بر میزان ریسک نظیر حاملگی چندقلویی / وزن متوسط مادر باردار / سن حاملگی / دیابت مادر باردار و.. تصحیح نمود که تحت عنوان مدین تصحیح شده در نرم افزار محاسبه کننده ریسک منظور خواهد گردید .

	Frist trimester		Frist and second trimester combind		Second Trimester		
Screening Protocol	Frist trimester Combind screen	Frist intrgrated screen	Intergrated screen	Sequential screen	Triple screen	Quarsruple screen	Panta screen
Downs syndrome detection Rate	85%	85%	92%	(97%)94%	64%	77%	84%
False positive (FPR) Rate	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%
OAPR	in 23 \	in 22 \	in 21 \	in 9 \ in16\	in 50 \	in 33 \	in25\
Trisomr 18 Detection Rate	80%	90%	90%	90%	70%	80%	90%
ONTD Detection Rate	-	80%	80%	80%	80%	80%	80%
Markers	NT+PAPP- A+F.B.hcG	PAPP-A +AFP+HCG inhibinA+ γ UE	NT+PAPP- A+hcG +AFP+hcG inhidinA+ γ UE	NT+PAPP- A+hcG +AFP+hcG inhidinA+ γ UE	AFP+hcG γ +UE	γ APP+hcG+UE inhibinA+	App+hcG+UE +inhibinA+ γ ITA
Timing	Wod 11	Wod 10 W6d 12	Wod 11 W6d 12	Wod 11 W6d 12	wod 10 w6d 12	wod 10 w6d 12	wod 10 wod 12

Mom serum markers

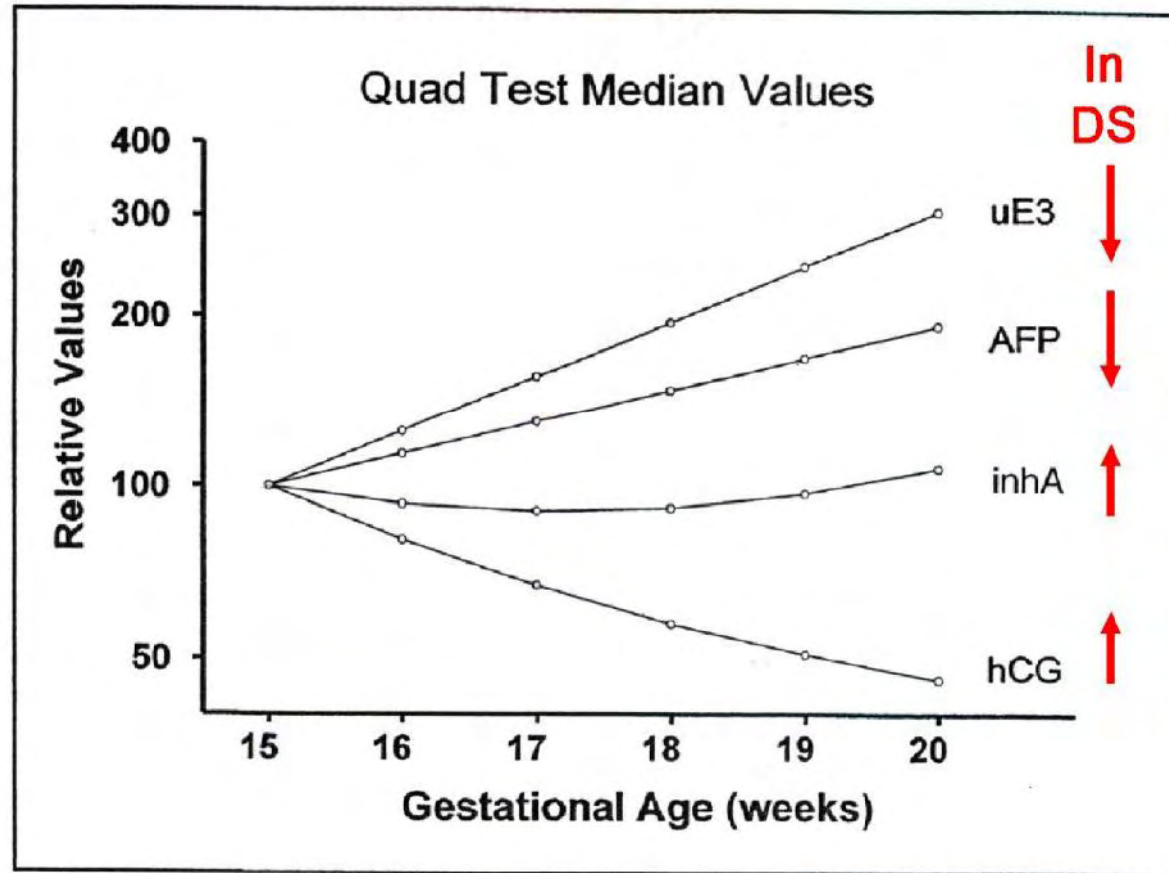
	AFP mom	HCG mom	mom γ UE	Inhibin mom	ITA mom
ONTD	High	Normal	Normal	Normal	Normal
Anecephaly	High	Normal	Low	Normal	Normal
Down's syndrome	Low	High	Low	High	High
Tomers syndrome without Hydrops fetalis with hydrops fetalis	Low Low	Low High	Low Low	Low / Normal High	Unknown
Fetal Demise	High / Low	High / Low	Low	High / Low	Unknown

Second Trimester Screen: Reference Range

Cut-off Used to Define a Normal Screen

Disorder	Normal Screen
Neural tube defect	<2.50 AFP MoM (singleton pregnancy) <1.90 AFP MoM (insulin-dependent diabetic) <4.00 AFP MoM (twins) <3.50 AFP MoM (insulin-dependent diabetic, twins)
Down syndrome	Risk <1:270
Trisomy 18	Risk <1:100

Second Trimester Medians



تأثیر سن حاملگی بر شاخص های سرمی غربالگری gestational age

در اوایل سه ماهه دوم سن حاملگی نوسانات شاخص های سرمی بسیار حساس می باشد به شکلی که به ازای هر هفته افزایش سن حاملگی میزان آلفا فتو پروتئین ۱۵٪ افزایش و میزان استریول آزاد ۲۵٪ افزایش را نشان می دهد لذا تخمین نادرست سن حاملگی توسط سونولوژیست کم تجربه منجر به محاسبات نادرست نرم افزار در تعیین ریسک ناهنجاری های ژنتیکی می گردد.

در سه ماهه دوم بارداری به ازای هر هفته سن حاملگی میزان بتا ساب یونیت به تدریج کاهش می یابد تا به سطح ثابتی برسد و تغییرات اینهبین بسیار ناچیز می باشد.

تاثیر دیابت وابسته به انسولین بر شاخص های سرمی غریبالگری مادران باردار

کاهش ۲۰٪ سطح سرمی آلفا فتوپروتئین در مادران باردار مبتلا به دیابت وابسته به انسولین مشاهده می گردد لذا ثبت سابقه دیابت در شرح حال مراجعین و تصحیح این فاکتور سرمی در نرم افزار ضروری می باشد.

تاثیر رقت خون مادران باردار بر شاخص های سرمی

آئمی فیزیولوژیک دوران بارداری که منجر به رقت خون می گردد بیشتر روی شاخص های سرمی بتاساب یونیت و آلفافتو و اینهیبین اثر کاهشی دارد و بر روی استریول آزاد تاثیر چندانی ندارد.

تاثیر وزن مادر باردار بر شاخص های سرمی غربالگری

بین وزن متوسط مادر باردار و تعداد شاخص های سرمی غربالگری رابطه ای وجود دارد به این صورت که هرچه تعداد شاخص سرمی غربالگری بیشتر باشد اهمیت و تاثیر وزن مادر باردار بر روی تعیین میزان ریسک کمتر خواهد شد .

در مادران باردار بالاتر از وزن متوسط (چاقی) میزان مدین تمام شاخص های سرمی خصوصا شاخص های تریپل مارکر افزایش یافته و این موضوع منجر به کاهش ریسک محاسبه شده بر اساس آلفا فتو و استریول آزاد و افزایش ریسک محاسبه شده بر اساس بتا ساب یونیت و اینهیبین می گردد و در ارتباط با مادران با وزن متوسط پائین (لاغر) عکس موارد فوق صادق می باشد . نتیجه این می باشد که در مادران باردار که بالاتر یا پائین تر از وزن متوسط می باشند از پانل کواد مارکر که تعداد شاخص سرمی بیشتری دارد و کمتر تحت اثر وزن مادر می باشد به جای پانل تریپل مارکر استفاده گردد .

قابل ذکر است که اهمیت تصحیح شاخص های سرمی بر اساس وزن متوسط مادر باردار در نقص لوله های عصبی و ترایزومی ۱۸ بالاتر از سندرم داون می باشد لذا نرم افزار های موجود بایستی قابلیت تصحیح فاکتورهای سرمی متناسب با وزن متوسط مادر را دارا باشند.

تأثیر حاملگی های چند قلویی بر شاخص های سرمی غربالگری

در حاملگی های چند قلویی شاخص های سرمی چندان ارزش تفسیری مناسبی ندارند و قابل توصیه نمی باشند .

در این گروه ممکن است علیرغم نتایج مثبت یک یا چند قل سالم باشند و صرفاً یک قل اختلال کروموزومی داشته باشد و بالعکس در اسکرین های منفی نیز نتایج غیرقابل پیش بینی وجود دارد . لذا توصیه می گردد در صورت استفاده از این مارکر های بیوشیمیائی سرمی از فاکتور های تصحیحی مناسب در صورت چند قلو بودن جنین استفاده گردد .

NT (Nuchal Translucency) & Double marker Combined FTS(First Trimester Screening)

اندازه گیری تجمع مایع پشت گردن جنین و ارتباط آن با ریسک سندرم داون در سه ماهه اول بارداری این تست همراه با **تست دابل مارکر** که شامل تست های زیرمی باشد در تعیین ریسک داون در سه ماهه اول بارداری بسیار کمک کننده است

Free BHCG & PAPP-A

PAPP-A = Pregnancy Associated Plasma Protein A

مجموع دابل مارکر سرمی با تست اندازه گیری تجمع مایع پشت گردن جنین تحت عنوان

تست ترکیبی غربالگری سه ماهه اول نامیده می شود و زمان مناسب انجام هفته ۱۱-۱۳ می باشد .

مزیت و ویژگی مثبت تست ترکیبی غربالگری سه ماهه اول شناسایی ریسک سندرم داون در سه ماهه اول و قبل از هفته ۱۴ می باشد و می توانند مشاوره های ژنتیک و نمونه برداری از پرز های جفتی را به عنوان تست های تکمیلی انجام دهند

نقص و نقطه ضعف تست ترکیبی غربالگری سه ماهه اول عدم توانایی تست در غربالگری نقص لوله های عصبی می باشد ONTD

First Trimester Screening

- FreeBeta / PAPP-A / NT/ NB Screening
- 11-14 wk Fetal Ultrasound Exam
- CVS (Early Amniocentesis N/A)

Second Trimester Screening

- AFP &/or Ultrasound
- NT $\geq 3.0\text{mm}$ in 1st then Fetal Anatomy and Heart Ultrasound in 2nd

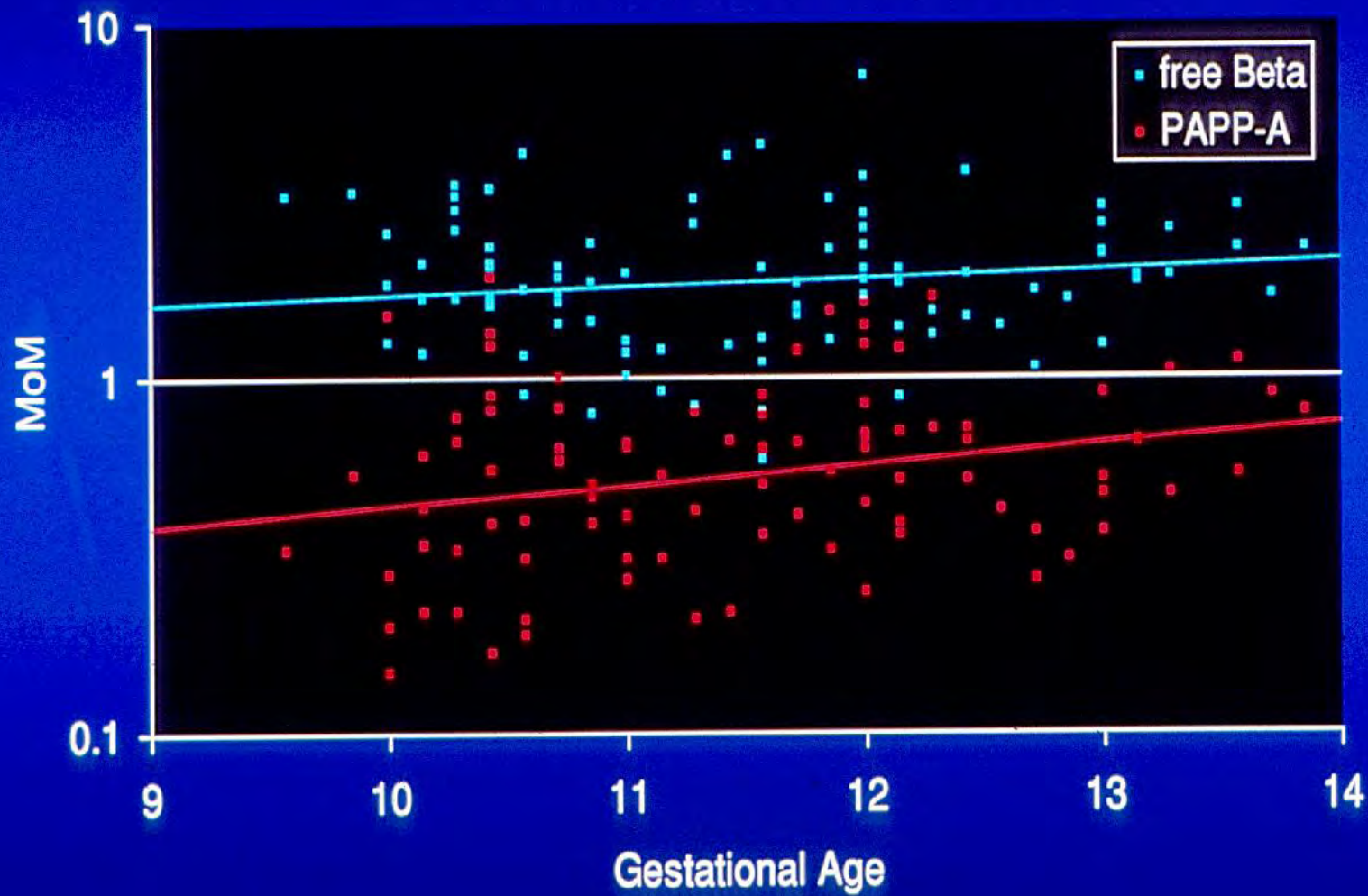
A National Standard Must Be Maintained

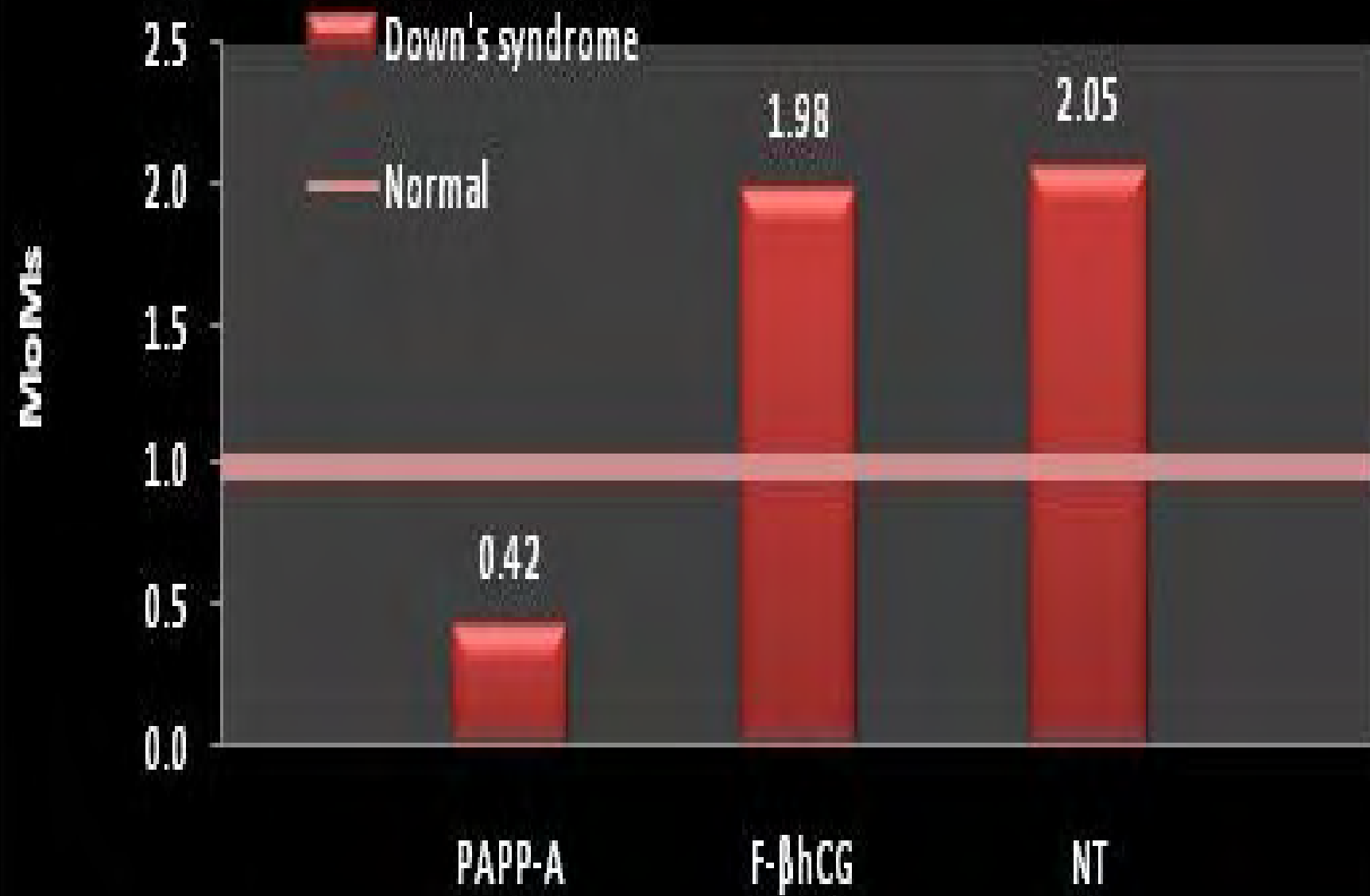
Everyone who does ultrasound should NOT do NT unless they have gone through the training for numerous reasons but mostly for consistency.

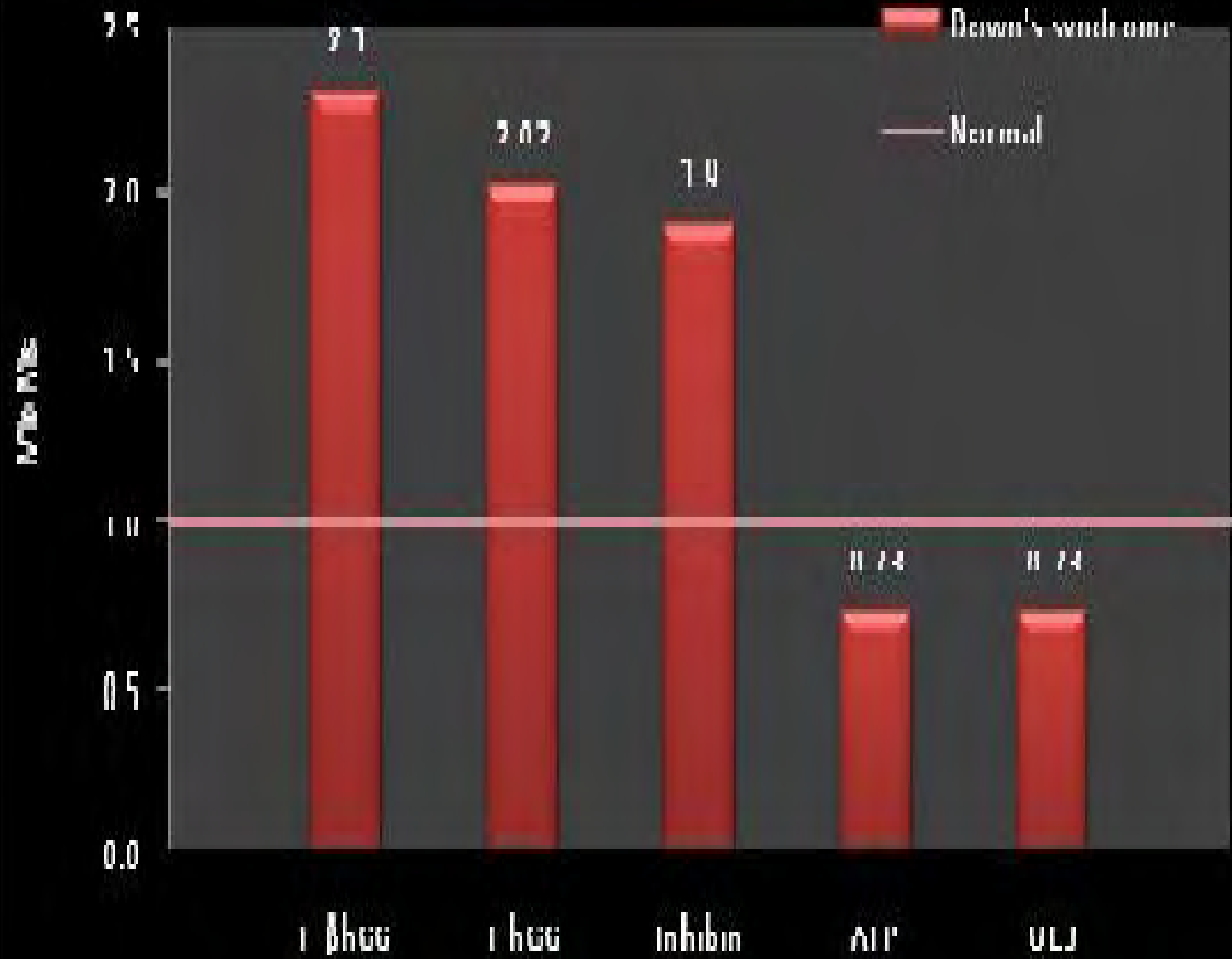
Most labs for bloods (PAPP A and hCG will not accept specimen without certification number)

First Trimester Biochemical Screening

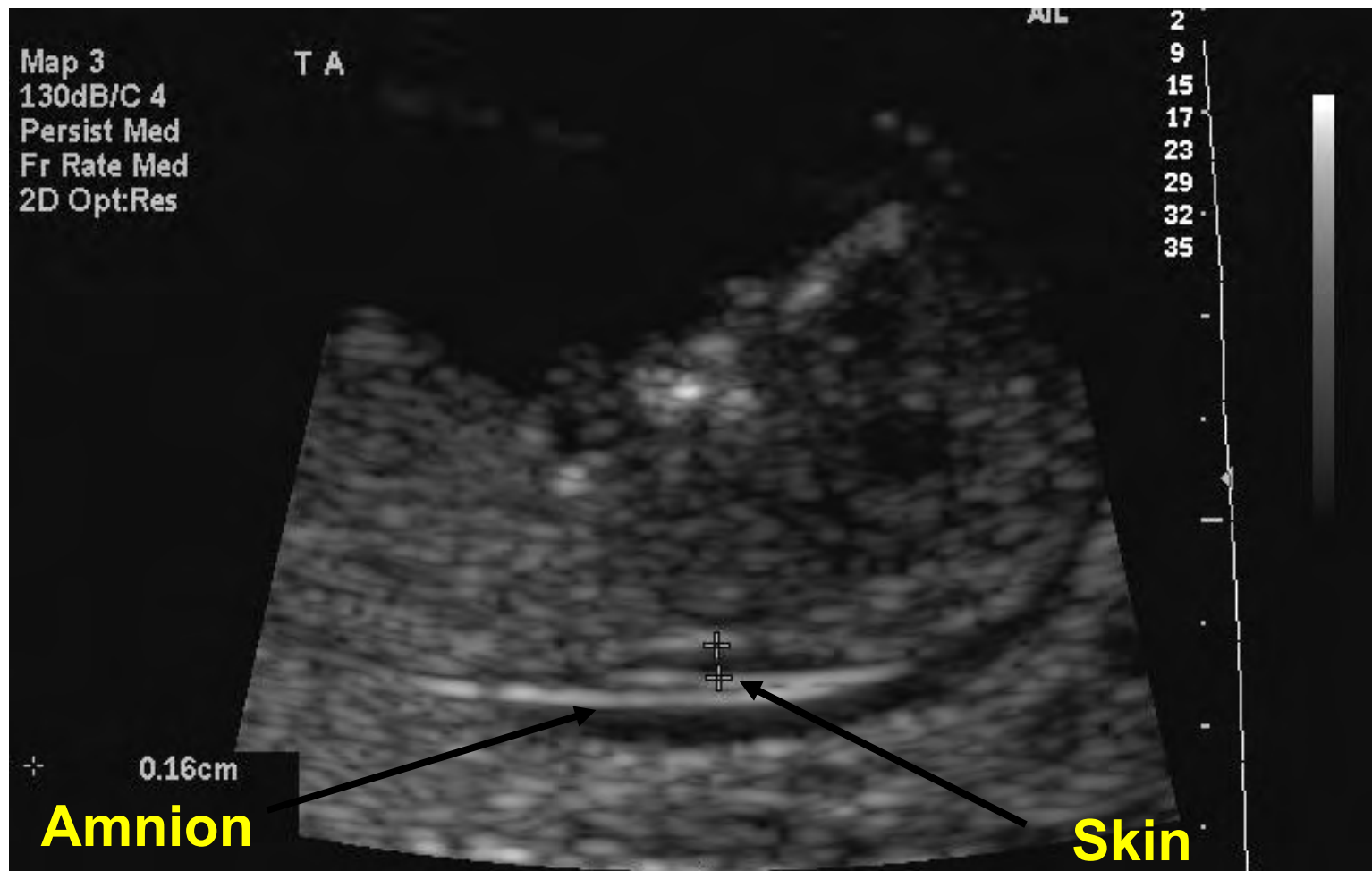
Down Syndrome Cases

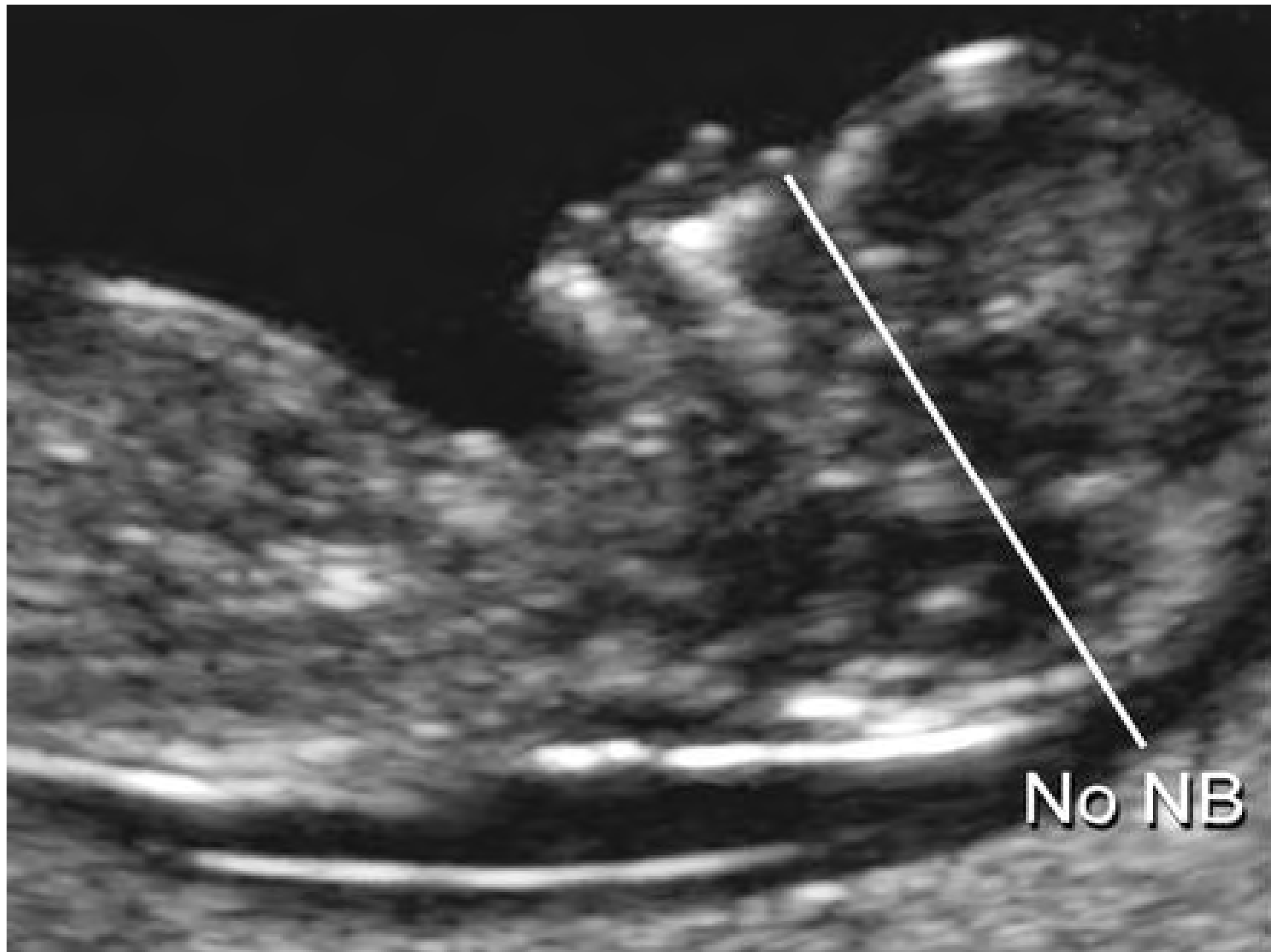






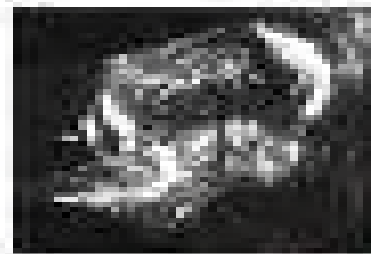
Nuchal Translucency (NT)



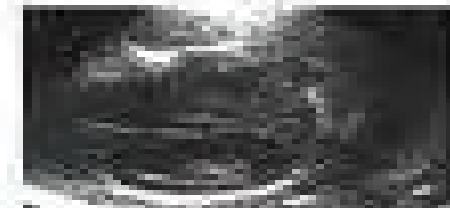


No NB

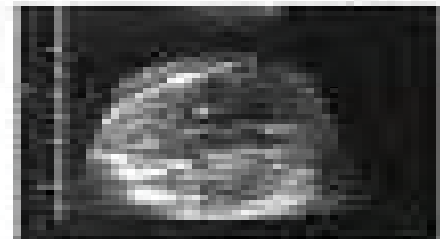
Trisomy 21



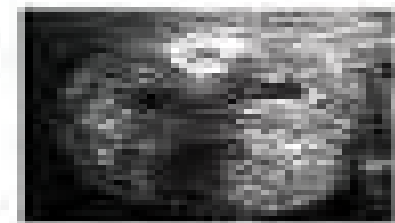
Nuchal Thickening



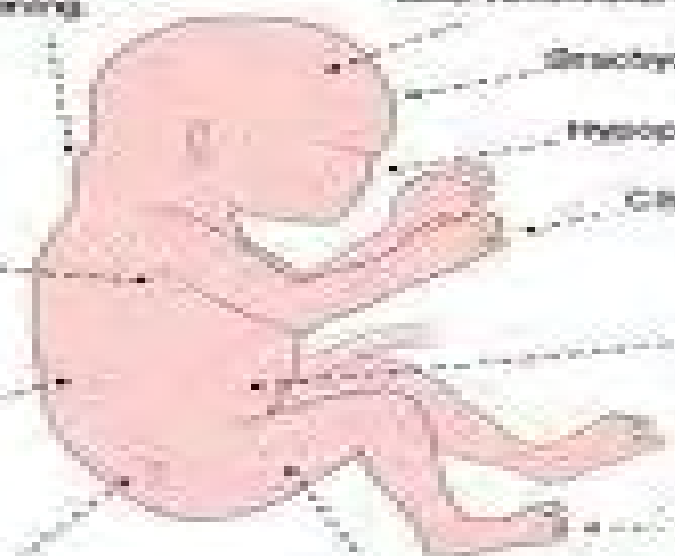
Mild Ventricular Dilatation



Echogenic Intracardiac Focus



Pylectasis



Sacrocyphosis

Hydrocephalic Head

Clonusality

Sacral Gap



Hyperechoic Bowel



Shortened Limbs

Indented Penis

Problems with Second Trimester Screening

- **False positives**
 - **Patient anxiety**
 - **Lessened by better pre-test counseling**
 - **Unnecessary amniocentesis**
 - **Procedural loss 0.5%**
- **Late diagnosis**
 - **Psychologically and technically more difficult to terminate**
- **Suboptimal sensitivity**

Advantages to 1st Trimester Screening

- **Earlier diagnosis**
 - **Pregnancy less obvious, more private**
 - May be less bonding
 - **Pregnancy termination easier and safer**
- **Surveys: Many patients prefer it**
- **CAVEAT: Need test to have high sensitivity and low false positives**
 - **Account for spontaneous (and procedural) losses**
 - Preferentially identify high risk for loss?

Biochemical Markers

- **Pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A)**
 - Protease for IGF binding protein
 - Decreased with trisomies
- **Human chorionic gonadotropin (β hCH)**
 - Increased with 21 and 18, decreased with 13
 - Free versus Total?
- **PAPP-A and β hCG for Trisomy 21**
 - 60% sensitive, 5% false positive rate

سطح آلفا فتو پروتئین سرم مادران باردار با جنین مبتلا به سندرم داون

سطح آلفا فتو پروتئین سرم مادران باردار با جنین مبتلا به سندرم

داون ۲۵٪ کمتر از سطح سرمی آلفا فتوپروتئین مادران

باردار با حاملگی طبیعی می باشد و همراه با مارکر آلفا فتو پروتئین

دو مارکر سرمی با ارزش بتا ساب یونیت تام و استریول غیر کنژوکه

مجموعاً پانل تریپل مارکر را به عنوان مارکر سرمی غربالگری سندرم

داون در سه ماهه دوم بارداری تشکیل می دهند .

سطح سرمی بتا ساب یونیت تام در حاملگی های سندرم داون تا ۲ دو برابر

حد نرمال در سه ماهه دوم بارداری افزایش می یابد و سطح سرمی

مارکر استریول غیر کنژوکه مشابه آلفا فتوپروتئین ۲۵٪ در سه ماهه

دوم بارداری کاهش می یابد ولی بایستی توجه داشت که ارزش تشخیصی

مارکر استریول آزاد (غیر کنژوکه) نسبت به مارکر آلفا فتوپروتئین در

تشخیص سندرم داون بالاتر می باشد .

Total BHCG marker مارکر بتا ساب یونیت توتال

روند افزایش فیزیولوژیک بتا ساب یونیت در سه ماهه اول بارداری رخ می دهد که معمولاً در هفته دهم به حداکثر میزان (پیک) خود می رسد (تیترا ۲۰۰۰۰۰ الی ۴۰۰۰۰۰) و در سه ماهه دوم بارداری (خصوصاً هفته ۱۸ الی ۲۰ بارداری) به سطح نسبتاً پایداری می رسد (تیترا حدود ۲۰۰۰۰۰) و معمولاً نیز تا پایان دوران بارداری در همین سطح پایدار باقی می ماند .

در حاملگی همراه با سندرم داون میزان بتا ساب یونیت توتال و آزاد در سه ماهه اول و دوم بارداری تا دو برابر سطح نرمال افزایش می یابد با این تفاوت که اندازه گیری بتا ساب یونیت آزاد در سه ماهه اول و بتا ساب یونیت توتال در سه ماهه دوم بارداری دارای ارزش تشخیصی مناسب می باشد .

نکات مهم در مورد موارد مثبت کاذب تست بتا ساب یونیت

- High FSH & LH
- High level Heterophil Ab in serum maternal
- High level RF in serum maternal
- Doping with external HCG (stimulate steroid hormone)
- Random analytical error (repeat HCG with other kit or method)
- Hyper level HCG with trophoblastic neoplasm or choriocarcinoma (fallow with CT & chemotherapy)
- Hyphophys HCG

مارکر سرمی استریول آزاد

(unconjugated) Free esteriol marker

منشا اصلی تولید استریول آزاد در کبد و ادرنال جنین می باشد که از طریق جفت این هورمون به داخل سرم مادر وارد می شود لذا می توان نتیجه گیری نمود قسمت عمده استریول آزاد در سرم مادر دارای منشا جنینی می باشد .

اندازه گیری استریول آزاد در سه ماهه اول (قبل از هفته ۱۵) فاقد ارزش بالینی و تشخیصی بوده و بهترین ارزش تشخیصی استریول آزاد در سه ماهه دوم بارداری (هفته ۱۴ الی ۲۱) می باشد که در تشخیص و غربال سندرم داون بسیار کمک کننده می باشد .

استریول آزاد در سه ماهه سوم به پیک مقدار خود می رسد .

DIA(Dimer .Inhibin.A) marker مارکر سرمی اینهیبین

مارکر اینهیبین یک گلیکوپروتئین مترشحه از جفت در دوران بارداری می باشد که عملکرد اصلی فیزیولوژیک آن مهار ترشح گنادوتروپین ها از هیپوفیز قدامی می باشد .

مارکر سرمی اینهیبین در سه ماهه دوم بارداری دارای بیشترین نرخ تشخیصی بوده (در سه ماهه اول بارداری فاقد ارزش تشخیصی می باشد) . قابل ذکر است در حاملگی های همراه با سندرم داون ترشح مارکر اختصاصی اینهیبین آ بیش از حد فیزیولوژیک آن خواهد بود . اضافه شدن مارکر سرمی اختصاصی اینهیبین به همراه مارکرهای سه گانه (تریپل مارکر بتا ساب یونیت توتال / استریول آزاد / آلفا فتو پروتئین) پانل کواد مارکر را تشکیل می دهد که نسبت به پانل تریپل مارکر ارزش تشخیصی بالاتری برای سندرم داون خواهد داشت (۵ الی ۱۰ درصد ارزش تشخیصی کواد مارکر بالاتر از تریپل مارکر می باشد)

PAPP.A (Pregnancy-associated plasma protein-A)

پروتئین پلاسمائی وابسته به حاملگی

گلیکوپروتئین مترشحه از جفت می باشد که عملکرد فیزیولوژیک شناخته شده ای ندارد و میزان آن با افزایش سن حاملگی بالا می رود ولی صرفاً در سه ماهه اول بارداری (خصوصاً هفته ۱۰ الی ۱۴) اندازه گیری آن دارای ارزش بالینی و تشخیصی می باشد . اندازه گیری پروتئین پلاسمائی وابسته به حاملگی همراه با بتا ساب یونیت آزاد در هفته ۱۰ الی ۱۴ تحت عنوان دابل مارکر قابل انجام و قابل توصیه می باشد .

نکته مهم: در ترایزومی ۱۸ یا سندرم ادواردز که یکی از ناهنجاری های ژنتیکی جنین به دلیل عدم جداسدن کروموزوم های جنین در حین لقاح و میوز می باشد مشابه سندرم داون با کاهش سطح سرمی آلفا فتوپروتئین و استریول آزاد در سه ماهه دوم بارداری مواجه هستیم ولی برخلاف سندرم داون که با افزایش شدید سطح بتا ساب یونیت همراه است در ترایزومی ۱۸ سطح بتا ساب یونیت به طور قابل ملاحظه ای کاهش می یابد

Integrated Prenatal Screen (IPS)

غربالگری تلفیقی (یکپارچه/ جامع) سه ماهه اول و دوم بارداری

در سال ۲۰۰۲ تست غربالگری تلفیقی معرفی گردید .

در روش یکپارچه (تلفیقی) ترکیبی از مارکر های سه ماهه اول و دوم و سن مادر برای محاسبه ریسک سندرم داون به کار می رود با این تفاوت که مارکر بتا ساب یونیت آزاد از مارکر های سه ماهه اول حذف گردیده (به دلیل تداخل آن با بتا ساب یونیت در تست کواد سه ماهه دوم) .

بیمار در دو نوبت نمونه گیری می گردد (سه ماهه اول و سه ماهه دوم) ولی نتیجه تست تلفیقی غربالگری صرفاً یک بار به بیمار گزارش می گردد و آن هم در پایان انجام تست کواد در سه ماهه دوم بارداری

Serum integrated prenatal screen (s IPS) =

{PAPP-A} + {quad screen} without NT & free BHCG in first trimester

Integrated Prenatal Screen (IPS)

غربالگری تلفیقی (یکپارچه) سه ماهه اول و دوم بارداری

مزیت این روش ارزش تشخیصی بالای آن (۸۶٪) و مثبت کاذب پائین آن می باشد .

عیب روش این است که چون بین دو مرحله انجام آزمایش ۲ الی ۳ هفته فاصله وجود دارد بیمار شانس انجام نمونه برداری جفتی (سی وی اس) را از دست می دهد .

میزان تشخیص روش یکپارچه (تلفیقی) سرمی ۸۶٪ است و برای کسانی که به سونوگرافی دقیق (برای اندازه گیری تجمع مایع در گردن جنین) دسترسی ندارند بسیار تست مناسبی است .

Sequential Screening

غربالگری متوالی

روش غربالگری متوالی به صورت مرحله به مرحله و مشروط اجرا می شود به این معنی که غربالگری سه ماهه اول کامل صورت می گیرد اگر ریسک بالا بود (بالاتر از ۱ به ۴۰) بیمار برای مشاوره ژنتیک و سی وی اس (نمونه برداری جفتی) کاندید می شود و اگر ریسک در سه ماهه اول متوسط (بین ۱ به ۴۰ تا ۱ به ۲۰۰۰) بود بیمار در سه ماهه دوم تست غربالگری کواد را انجام می دهد و اگر ریسک در سه ماهه اول پائین بود (۱ به ۲۰۰۰ به بالا) نیاز به تست کواد در سه ماهه دوم نمی باشد

مزیت روش غربالگری متوالی : علاوه بر میزان تشخیص بالا (حدود ۹۰٪) و مثبت کاذب پائین (۵٪) از تعداد غربالگری غیر ضروری در سه ماهه دوم کم می شود

quad Screen Test

در بارداری متاثر از سندرم داون سطح سرمی دو مارکر بتا ساب یونیت و اینهیبین بالا بوده و بیشتر از مدین است و بالعکس سطح سرمی دو مارکر آلفا فتو پروتئین و استریول آزاد کاهش یافته و کمتر از مدین است .

MOM (Multiple Of Median) = measured marker / median marker (base on gestation week)

Mom Syndrome down :

MoM >1 for BHCG & Inhibin-A

MoM <1 for APF & UE3

مدین های بدست آمده از نتایج بیماران باید بر اساس پارامتر اصلی سن دقیق بارداری (محاسبه از طریق سونوگرافی صحیح است و محاسبه تخمینی ارزش ندارد) و پارامترهای جانبی نظیر مصرف سیگار / دیابت / بارداری از طریق لقاح / بارداری دوقلو و غیره محاسبه گردد و در محاسبات آماری نرم افزار مورد استفاده قرار گیرند .

نکته مهمتر این است که مدین های هر بیمار بایستی بر اساس مدین های همان جامعه محاسبه گردد .

تست پنتا مارکر (پنتا اسکرین)

- تست پنتا مارکر (پنتا اسکرین) که متشکل از مارکرهای AFP ، hcG Free ، استریول آزاد (UE3) ، inhibinA و ITA در سه ماهه دوم بود ، معرفی شد ، که **اضافه شدن مارکر ITA به تست کواد مارکر به میزان % ۶-۷ نرخ تشخیص سندرم داون را افزایش میدهد .**
- نرخ تشخیص پنتامارکر برای تشخیص سندرم داون بیشتر نرخ تشخیص در میان تمام پروتکل های غربالگری سه ماهه دوم بوده و برابر با **% ۸۴** است .
- **در تست پنتامارکر همانند تست کواد مارکر ریسک تفکیک کننده ۲۵۰ : ۱ می باشد .**
- **در پروتکل های غربالگری هرچه از مارکرهای بیشتری استفاده شود نرخ تشخیص تست افزایش می یابد ،** در این روند نرخ تشخیص سندرم داون از سال ۱۹۸۴ تا سال ۲۰۰۰ از % ۴۰ (برای تست AFP) به % ۸۵ (برای غربالگری توام سه ماهه اول) افزایش یافت و پس از آن ترکیب مارکرهای ۳ ماهه اول و ۳ ماهه دوم ، نرخ مزبور به % ۹۲ رسید .

(ITA) Invasive Trophoblast Antigen

- ITA یک واریانت قندی شده از hcG با زنجیره های جانبی اولیگو ساکاریدی بیشتر است . ITA توسط سلولهای تروفوبلاست مهاجمی تولید می شود . **سطح ITA در اوایل بارداری به سرعت افزایش یافته ، در هفته نهم بارداری به حداکثر می رسد و سپس رو به کاهش می گذارد . نسبت ITA به کل hcG در هفته های ۴ تا ۶ بارداری حدود ۲۶% ، در هفته های ۶ تا ۸ بارداری حدود ۱۱% ، در ماه سوم بارداری حدود ۲.۹% و در سه ماهه سوم بارداری حدود ۲% است . سطح ITA در بارداری های متأثر از سندرم داون بیش از حد معمول است .**

احتمال مبتلا بودن جنین در صورت مثبت بودن جواب تست غربالگری
OAPR «odds of being affected given a positive result »

- به هیچ وجه عنوان نباید انتظار داشت تمام و یا در صد زیادی از کسانی که نتیجه تستهای غربالگری آنان مثبت است ، دارای جنین های مبتلا باشد .
OAPR به صورت 1 : n نشان داده می شود .
- **به عنوان مثال اگر OAPR برای یک پروتکل غربالگری سندرم داون ۱ : ۲۰ باشد بدان معناست که از هر بیست نفری که نتیجه غربالگری آنها مثبت است ، تنها یک نفر دارای جنین مبتلا به سندرم داون است .**
- **OAPR شاخصی از ارزش پیشگویی مثبت یک تست غربالگری است که به صورت درصد بیان می شود در پایان لازم به یاد آوری است که کالج های طب زنان و زایمان آمریکا در سال ۲۰۰۷ رسماً توصیه کرد که تمامی زنان باردار ، صرف نظر از سن آنان ، مورد آزمون های غربالگری سندرم داون قرار گیرند .**

نتیجه گیری

روش های غربالگری سرمی موجود صرفاً یک روش نسبتاً کم خطرتر و کم هزینه تر برای استفاده جهت کلیه مادران باردار می باشد که هدف اصلی ان هدایت گروه مادران پرخطر به سمت روش های پرهزینه و تهاجمی (تائیدی نهائی) می باشد لذا بایستی توجه داشت **علیرغم تکمیل پانل های غربالگری سرمی جدید)** روش کواد و پنتا مارکر / روش ترکیبی و الحاقی (که منجر به بالاتر رفتن نرخ تشخیصی آنها گردیده است کماکان این روش ها غربالگر گروه کم خطر و پرخطر در زنان باردار جامعه می باشند و قطعی نمی باشند و برای تائید موارد مثبت نیاز به روش های تهاجمی تائیدی نظیر آمنیوسنتزیس دارند . در این روش ها نه می توان اسکرین مثبت غربالگری سرمی را مثبت قطعی بدانیم و نه می توان با در دست داشتن نتایج اسکرین منفی با قاطعیت ناهنجاری های کروموزومی را رد نمائیم.

چه روشی برای زنان باردار بایستی انتخاب نمود

مهمترین معیار برای انتخاب روش غربالگری میزان تشخیص بالا و درصد مثبت کاذب پائین می باشد

۱- کسانی که در سه ماهه دوم (هفته ۱۴ به بعد) مراجعه می نمایند تست غربالگری کوادمارکر بهترین انتخاب است

۲- برای کسانی که در سه ماهه اول به پزشک مراجعه می نمایند تست غربالگری جامع (تلفیقی) یا تست غربالگری متوالی قابل پیشنهاد است و در بین این دو گروه تست غربالگری اگر کلیه روش های استاندارد سونوگرافی در دسترس باشد روش غربالگری متوالی ارجح است چرا که از انجام غیر ضروری کواد مارکر در سه ماهه دوم جلوگیری می نماید

۳- در بارداری های چند قلوئی مارکر های سرمی قطعیت زیادی ندارند و دارای حساسیت کمتری نسبت به روش های سونوگرافی می باشند و در این شرایط یکی از بهترین تست ها اندازه گیری تجمع مایع در پشت گردن جنین است

در چه مواردی تکرار تست غربالگری الزامی و ضروری است

در صورتی که ریسک مادری با در نظر گرفتن تمام موارد فوق همچنان بالا باشد ، تکرار آزمایش به هیچ عنوان توصیه نمی شود (مگر آنکه به کیفیت و صحت انجام آزمایشات خویش در حوزه تست های تریپل و کواد مطمئن نباشیم) و در صورتی که آزمایش پس از مدتی تکرار شود ، هر کدام که ریسک بالاتری را نشان دهد معتبرتر است و باید مورد قضاوت قرار گیرد.

پی گیری نتایج NTDs

۹۵٪ جنین های مبتلاء به NTDs در خانواده هایی متولد می شوند که هیچ سابقه ای از NTDs در آنها وجود ندارد. در صورتی که AFP MOM برابر با 2.5 (برابر ریسک ۱۰۰:۱) به عنوان ریسک تفکیک کننده تعیین شود ، نرخ تشخیص AFP برابر NTDs حدود ۹۰٪ با ۵٪ مثبت کاذب خواهد بود.

اگر ریسک NTDs کمتر از ریسک تفکیک کننده (۱۰۰:۱) باشد ، می توان گفت غربالگری NTDs پایان پذیرفته است.

در صورتی که AFP MoM مادری بیش از 2.5 باشد (ریسک بیشتر از ۱۰۰:۱) بررسی سونوگرافی برای تعیین سن دقیق جنین ، زنده بودن و تعداد جنین ها توصیه می شود و همزمان مارکرهاي سونوگرافی NTDs (آنسفالی ، نقص های کرانیال ، نقص های ستون مهره ای) مورد بررسی قرار می گیرد

پی گیری نتایج NTDs

- در بسیاری از موارد تخمین کمتر از واقع سن جنین باعث افزایش کاذب ریسک NTDs می شود. در چنین مواردی پس از تعیین سن دقیق جنین ، از آزمایشگاه درخواست می شود تا مجدداً ریسک را با توجه به سن جدید تعیین شده محاسبه کند. اگر مادر زودتر از هفته چهاردهم بارداری مراجعه کرده باشد ، نمونه مجدد پس از چهارده هفتهگی جنین گرفته می شود.

- در مواردی که **AFP MoM** بین 2.5 تا 3.5 باشد ، تکرار اندازه گیری **AFP** پس از یک هفته کمک زیادی به تشخیص مادرانی که واقعاً در معرض ریسک بالا هستند ، می کند ؛ در صورتی **AFP MoM** نمونه مجدد به زیر ۲ رسیده باشد غربالگری NTDs پایان پذیرفته و نتیجه نرمال ریسک است و در صورتی که **AFP MoM** نمونه مجدد همچنان بالا باشد ، لازم است تا اقدامات بعدی برای تشخیص صورت پذیرد. در صورتی که **AFP MoM** بیش از 3.5 باشد نیازی به تکرار مجدد **AFP** نیست و اقدامات تشخیصی انجام می شود.

- **اقدامات تشخیصی بعدی NTDs ، شامل آمنیوستنز و اندازه گیری AFP مایع آمنیوتیک است.** در صورتی که AFP مایع آمنیوتیک بالا باشد اندازه گیری استیل کولین استراز بر روی همان نمونه انجام می شود. پس از اطمینان از عدم آلودگی نمونه به خون ، وجود این آنزیم در معرض بودن بافت عصبی و یا نقص های جنینی باز را تأیید می کند.
- **از آنجا که گاهی NTDs با آنوپلوئیدی همراه است بعضی مراجع توصیه می کنند در صورتی که سطح AFP سرمی و مایع آمنیوتیک هر دو بالا باشد حتی اگر استیل کولین استراز مایع آمنیوتیک منفی باشد ، کاریوتایپینگ برای تشخیص اختلالات کروموزومی بر روی مایع آمنیوتیک انجام شود.**
- **گاهی بی هیچ توضیحی سطح AFP سرمی بالا است. مطالعات متعددی نشان داده اند که افزایش غیر قابل توضیح AFP سرمی معمولاً پیشگوی نتایج ضعیف بارداری است . این نتایج شامل وزن پایین نوزاد هنگام تولد ، پارگی جفت و مرگ جنین است.**

پی گیری نتایج سندرم داون (تریزومی ۲۱)

ریسک تفکیک کننده ای که برای تفکیک بیماران دارای ریسک نرمال و ریسک بالا در تست کوآد مارکر تعریف شده است ، ریسک ۲۵۰ : ۱ است.

با در نظر گرفتن این ریسک تفکیک کننده تست کوآد مارکر نرخ تشخیص حدود ۸۰٪ و نرخ مثبت کاذبی برابر ۵٪ خواهد داشت.

در صورتی که ریسک تفکیک کننده را به ۳۰۰ : ۱ تقلیل دهیم نرخ تشخیص تست کوآد مارکر به ۸۵٪ افزایش می یابد ، اما نرخ مثبت کاذب آن نیز ۱۰٪ می گردد.

از این رو در کشورهای مختلف بر حسب بودجه ای که برای طرح های غربالگری در نظر گرفته می شود ، ریسک های تفکیک کننده مختلفی انتخاب می گردد. در ایران با توجه به نبود هر گونه برنامه و بودجه دولتی برای انجام غربالگری سندرم داون ۲۵۰ : ۱ به عنوان ریسک تفکیک کننده انتخاب شده است. انتخاب ریسک های بالاتر از ۲۵۰ : ۱ (۲۰۰ : ۱ یا ۱۵۰ : ۱) به علت کاهش شدید نرخ تشخیص پیشنهاد نمی گردد.

توصیه می شود که قبل از انجام تست کوآد مارکر حتماً یک سونوگرافی برای تعیین دقیق سن جنین انجام گیرد.

در صورتی که نتیجه تست کوآد مارکر برای تریزومی ۲۱ کمتر از ریسک تفکیک کننده باشد (۱:۲۵۰ <) می توان گفت غربالگری سندرم داون پایان پذیرفته است و لازم نیست تا بررسی بیشتری بر روی مادر انجام شود.

در صورت تمایل پزشک ، مادرانی که در معرض ریسک تا ۱:۳۰۰ باشند می توانند مورد بررسی بیشتر سونوگرافی ، از نظر مارکرهای سونوگرافی سندرم داون و تأیید مجدد سن بارداری قرار گیرند. مارکرهای سونوگرافی متعددی (نظیر Nuchal Fold بیش از ۶ میلی متر با نرخ تشخیص حدود ۴۵٪ ، هایپوپلازی بند میانی انگشت کوچک دست با نرخ تشخیص ۶۰٪ ، کاهش طول لاله گوش با نرخ تشخیص ۵۵٪ و غیره) برای غربالگری سندرم داون در سه ماهه دوم وجود دارد لازم به ذکر است ، مارکرهای سونوگرافی نیز تماماً ویژه غربالگری هستند و هیچ یک از آنها مارکر تشخیصی به حساب نمی آید.

پی گیری نتایج تریزومی ۱۸

- بر خلاف تریزومی ۲۱ و NTDs، اشتباه در تخمین سن بارداری باعث افزایش کاذب ریسک تریزومی ۱۸ نمی شود؛ از این رو بررسی مجدد سن بارداری به دنبال ریسک بالا ضرورتی ندارد.

- هر گاه ریسک تریزومی ۱۸ بیش از ۱:۱۰۰ باشد ابتدا مشاوره ژنتیک و بررسی سونوگرافیک جنین از نظر مارکرهای مرتبط انجام می شود و سپس آمنیوسنتز برای بررسی کروموزومی و تشخیص تریزومی ۱۸ صورت می پذیرد.

triple Screen Test

- Also Known as *Triple Test, Multiple Marker Screening and AFP Plus*
- The triple screen test is a maternal blood screening test that looks for three specific substances: **AFP, hCG, and Estriol.**
- **AFP:** *alpha-fetoprotein* is a protein that is produced by the fetus.
- **hCG:** *human chorionic gonadotropin* is a hormone produced within the placenta
- **Estriol:** *estriol* is an estrogen produced by both the fetus and the placenta
- It is **a non-invasive procedure done through a blood test with little to no known risk to the mother or developing baby.**

triple Screen Test

- **What is a screening test?**
- It is very important to remember what a screening test is before getting one performed. This will help alleviate some of the anxiety that can accompany test results. Screening tests do not look only at results from the blood test. They compare a number of different factors (including age, ethnicity, results from blood tests, etc...) and then estimate what a person's chances are of having an abnormality.
- **These tests DO NOT diagnose a problem; they only signal that further testing should be done.**

triple Screen Test

- **How is the triple screen test performed?**
- The triple screen test involves drawing blood from the mother which takes about 5 to 10 minutes. The blood sample is then sent to the laboratory for testing. The results usually take a few days to receive.
- **What are the risks and side effects to the mother or baby?**
- Except for the discomfort of drawing blood, there are no known risks or side effects associated with the triple screen test.

When is the triple screen test performed?

- The triple screen test is **performed between the 15th and 20th week of pregnancy** although results obtained in the 16th -18th week are said to be the most accurate.
- **All pregnant women should be offered the triple screen, but it is recommended for women who:**
 - Have a family history of birth defects
 - **Are 35 years or older**
 - Used possible harmful medications or drugs during pregnancy
 - Have diabetes and use insulin
 - Had a viral infection during pregnancy
 - Have been exposed to high levels of radiation

What does the triple screen test look for?

- The triple screen is measuring high and low levels of AFP and abnormal levels of hCG and estriol. The results are combined with the mother's age, weight, ethnicity and gestation of pregnancy in order to assess probabilities of potential genetic disorders.
- **High levels of AFP** may suggest that the developing baby has a **neural tube defect such as spina bifida or anencephaly**. However, the most common reason for elevated AFP levels is inaccurate dating of the pregnancy.
- **Low levels of AFP and abnormal levels of hCG and estriol may indicate that the developing baby has Trisomy 21(Down syndrome), Trisomy 18 (Edwards Syndrome) or another type of chromosome abnormality.**
- Although the primary reason for conducting the test is to screen for genetic disorders, the results of the triple screen can also be used to identify:
 - A multiples pregnancy
 - Pregnancies that are more or less advanced than thought

What do the triple test results mean?

- It is important to remember that **the triple test is a screening test and not a diagnostic test**. This test only notes that a mother is at a possible *risk* of carrying a baby with a genetic disorder.
- The triple screen test is known to have a high percentage of false positive results.
- A more conservative approach involves performing a second triple screen followed by a high definition ultrasound. If the testing still maintains abnormal results, a more invasive procedure like amniocentesis may be performed.
- Invasive testing procedures should be discussed thoroughly with your healthcare provider and between you and your partner. Additional counseling and discussions with a counselor, social worker or minister may prove helpful.

What are the reasons for further testing?

The reasons to pursue further testing or not vary from person to person and couple to couple. Performing further testing allows you to confirm a diagnosis and then provides you with certain opportunities:

- Pursue potential interventions that may exist (i.e. fetal surgery for spina bifida)
- Begin planning for a child with special needs
- Start addressing anticipated lifestyle changes
- Identify support groups and resources
- Make a decision about carrying the child to term
- Some individuals or couples may elect not to pursue testing or additional testing for various reasons:
 - They are comfortable with the results no matter what the outcome is
 - Because of personal, moral, or religious reasons, making a decision about carrying the child to term is not an option
 - **Some parents choose not to allow any testing that poses any risk of harming the developing baby**
- It is important to discuss the risks and benefits of testing thoroughly with your healthcare provider. Your healthcare provider will help you evaluate if the benefits from the results could outweigh any risks from the procedure.
-

quad Screen Test

در سال ۱۹۹۸ مارکر چهارم تحت عنوان اینهیپین آ به پاتل تریپل اضافه گردید و تست را به عنوان کواد کارکر تغییر داد و توانست میزان تشخیص سندرم داون را تا میزان ۸۰٪ افزایش دهد .

۱- آلفا فتوپروتئین (AFP)

یک پروتئین انکوفتال است که ساختمانی مشابه آلبومین دارد و در دوران جنینی در کیسه زرده و سپس از کبد جنین ترشح می گردد . **آلفا فتو پروتئین تا اواخر سه ماهه دوم بارداری به طور فیزیولوژیک افزایش داشته و در طول سه ماهه سوم بارداری کاهش می یابد و به تدریج جای خود را به آلبومین می دهد .**

سطح آلفا فتو پروتئین خون مادر در بارداری های متأثر از سندرم داون کمتر از حد معمول است .

۲- استریول غیر کنژوکه (آزاد) UE3:

در آدرنال و کبد جنین از منشا کلسترول سنتز می گردد / استریول آزاد در کبد مادر گلوکورونیزه شده و از طریق کلیه ها دفع می گردد. **استریول آزاد در سرم مادر تا اواخر بارداری افزایش می یابد**

سطح استریول آزاد خون مادر در بارداری متأثر از سندرم داون کمتر از حد معمول است .

quad Screen Test

۳- گونادوتروپین جفتی انسان (BhCG)

بتا ساب یونیت اولین محصول قابل اندازه گیری در جفت است که در هفته های اول بارداری هر روز تیترا آن دو برابر می گردد و در هفته ۱۲ به پیک خود می رسد و بعد از آن روند کاهشی تا پایان بارداری خواهد داشت

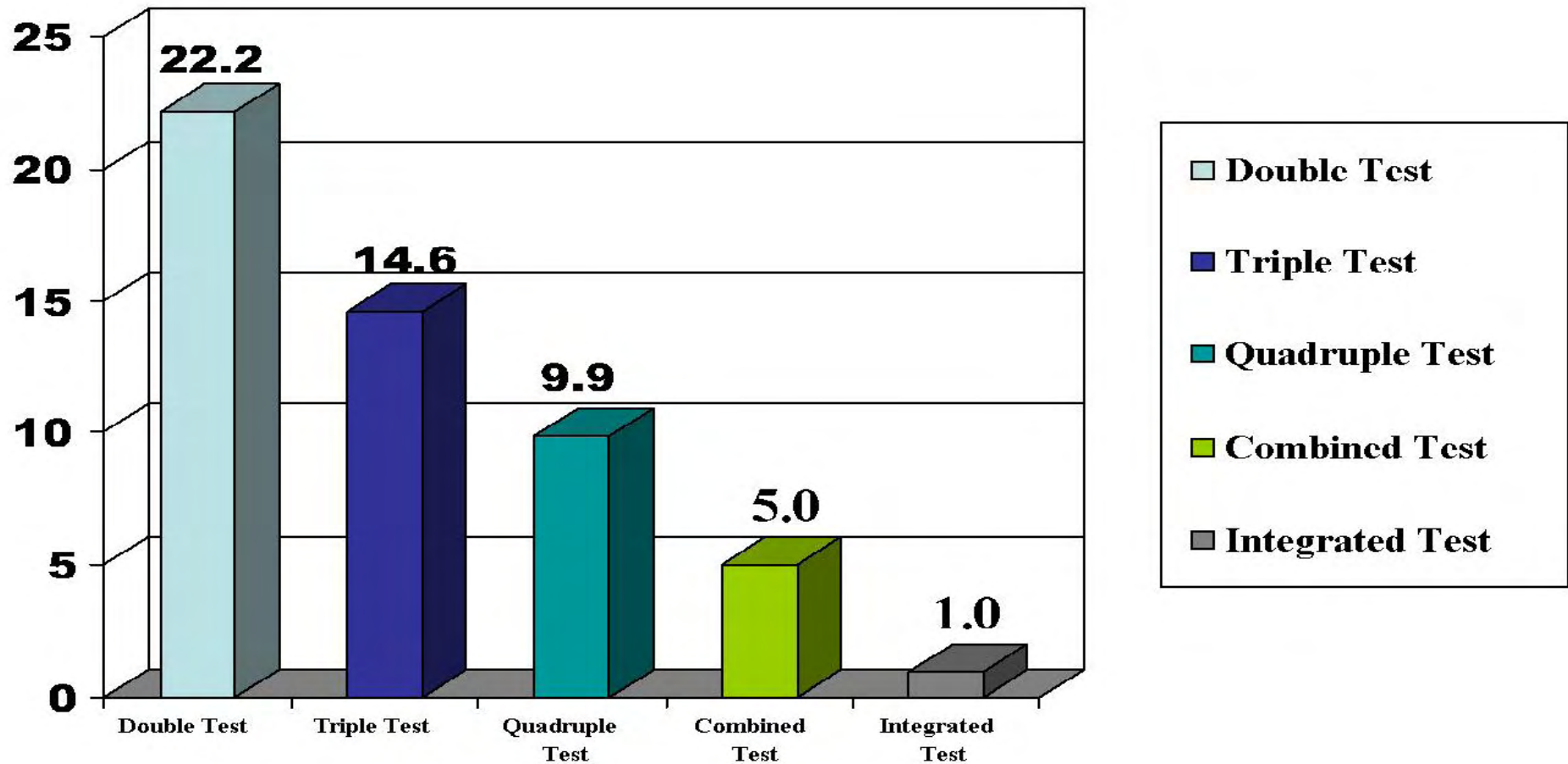
سطح بتا ساب یونیت خون مادر در بارداری های متأثر از سندرم داون بیشتر از حد معمول است .

۴- اینهیبین آ (Inhibin - A)

گلیکوپروتئین مترشحه از جفت به است که سطح آن تا هفته ۱۵ الی ۲۰ ثابت بوده و سپس با شیب تدریجی تا پایان بارداری افزایش خواهد داشت .

InhibinA در بارداری های متأثر از سندرم داون بیشتر از حد معمول است .

% of Women Requiring Amnio or CVS for a DR of 80%



Wald, et. al. NEJM, 341:7, 461-467

مقادیر غیر نرمال AFP

● افزایش در مقادیر سرم مادری:

- بیماری NTD
- نقصهای دیواره شکمی
- بارداری چندقلویی
- احتمال مرگ جنین

● کاهش در مقادیر سرم مادری:

- تریزومی ۲۱
- تریزومی ۱۸

مقادیر غیر نرمال استریول آزاد UE3

● کاهش در استریول آزاد :

- تریزومی ۲۱
- تریزومی ۱۸
- نقص در استروئید سولفاتاز
- و سندروم Opitz-Lemli-Smith

● افزایش در استریول آزاد :

- بارداریهای دو قلو

DIA / Inhibin A مقادیر غیر نرمال

● افزایش در:

● سندروم داون

Elevations also seen with twin demise and with ovarian
tumors ●

● پری اکلامپسی

مقادیر غیر نرمال در HCG

● کاهش در:

- بارداری خارج از رحمی
- مرگ جنین
- تریزومی ۱۸

● افزایش در:

- سندروم داون
- سندروم ترنر
- هیدروپس جنینی
- احتمال افزایش وقوع پری اکلامپسی ، افزایش فشار خون مادری و fetal distress

A photograph of a large, healthy bush with vibrant green, glossy leaves and numerous clusters of bright red, tubular flowers. The bush is set against a light-colored wooden fence. The text "THANK YOU" is overlaid in the center in a large, bold, red font with a white outline.

THANK YOU