

PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKA (PND) invazivní metody

vytvořilo CMBG FN Brno

zpracovala Mgr. Navaříková ve spolupráci s RNDr. Makaturovou



INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

- biopsie choriových klků (CVS) – chorion villi sampling
- odběr plodové vody (AMC) - amniocentesis
- odběr krve plodu (CC) – cordocentesis
(PUBS) – percutaneous umbilical blood sampling
(umbilical vein sampling, umbilical cord blood
sampling, fetal blood sampling)
- odběr buněk trofoblastu pronikajících do cervikálního kanálu
(TRIC) - Trophoblast Retrieval and Isolation from the Cervix
- odběr tkáně plodu z abortu



Klinické indikace k prenatálnímu stanovení karyotypu invazivními diagnostickými metodami

invazivní metody vyšetření karyotypu plodu jsou indikovány **při vyšším riziku narození dítěte s VCA (vrozenou chromosomovou abnormalitou)**

- **hodnoty biochemických markerů mimo normu (screening I., II. trimestru)**
- **věková indikace** (v kombinaci s dalšími rizikovými faktory)
 - věk matky – 35-37 let v roce porodu
 - věk otce – nad 40 let (riziko vyššího výskytu monogenních chorob)
 - součet věku rodičů – nad 70 let
- **VVV nalezené na UZ**
- **balancovaná VCA u rodičů**
- **výskyt VCA v rodině**
- **předchozí porod dítěte s VCA**



Riziko Downova syndromu v souvislosti s věkem matky

Riziko Downova syndromu u živě narozeného dítěte pouze na podkladě věku těhotné	
Věk	Odhad rizika
20 let	1 : 1923–1340
30 let	1 : 909–780
35 let	1 : 380–325
36 let	1 : 300–260
37 let	1 : 240–200
38 let	1 : 190–160
39 let	1 : 145–120
40 let	1 : 110–94

Zvyšování rizika narození plodu s Downovým syndromem v souvislosti s věkem matky
(Hájek Z. a kol. 2014)



INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY – postup vyšetření

Základní vyšetření:

Základním vyšetřením při PND jakékoliv indikace je vyšetření nebalancovaných chromosomových (genomových) aberací, které nejčastěji vznikají de novo a většinou mají závažný klinický obraz.

1. – QF-PCR zaměřená na STR polymorfismy (Short Tandem Repeats)
Stanovení počtu chromosomů 13, 18, 21, X, Y, (případně 15, 16, 22, kde je souvislost se samovolnými aborty). Porovnáním DNA profilů plodu a matky lze odhalit i přítomnost maternální kontaminace v odebraném materiálu plodu.
Toto vyšetření je indikováno při pozitivním výsledku screeningu na časté aneuploidie nebo při suspektním UZ nález. Výsledek do 1 – 2 pracovních dnů.
2. - Celogenomová chromosomová mikroarray (Chromosomal Microarray analysis, CMA).
CMA submikroskopické změny počtu kopií úseků na chromosomech – mikrodelece/ mikroduplikace – CNV (Copy Number Variation) s citlivostí 50 – 100 kb. Touto metodou jsou detekovány nebalancované chromosomové abnormality od velkých, viditelných ve světelném mikroskopu až po submikroskopické v souladu s rozlišovací schopností metody.
Existují dvě techniky CMA: array-CGH (komparativní genomová hybridizace kontrolní a vyšetřované DNA) a SNP array (kvantitativní genotypizace jednonukleotidových polymorfismů) – metody se doplňují.
Klinicky významné CNV jsou prokazovány u 5 – 10% vyšetřovaných plodů s mnohočetnými vadami a normálním karyotypem. Nález potenciálně klinicky významné CNV by měl být verifikován u rodičů stejnou technikou nebo jinými metodami.



INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY – postup vyšetření

Základní vyšetření:

3. - Při určitých indikacích je doporučeno klasické vyšetření karyotypu plodu (např. při familiární translokaci nebo verifikaci nálezu jinou metodou.)
4. - Sekvenování nové generace (NGS), prenatální vyšetření exomu (WES) – vyšetření v indikovaných případech

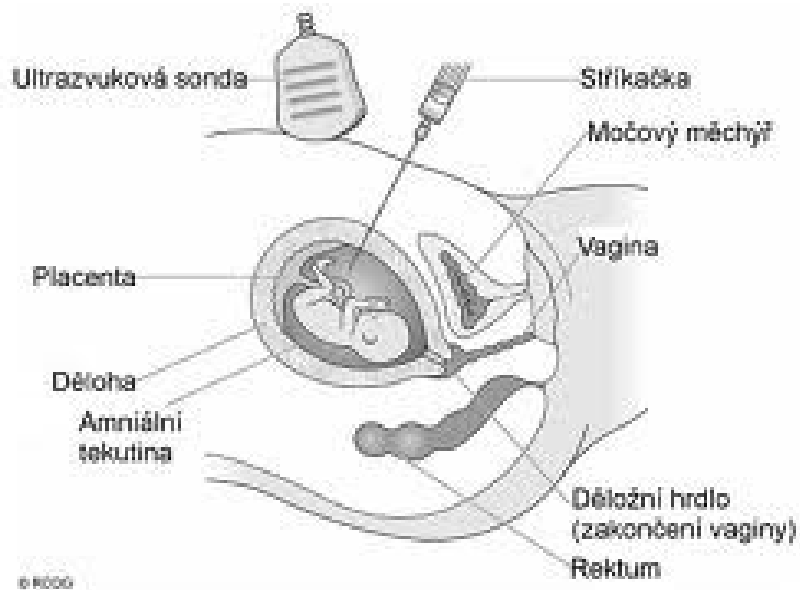
Cílená vyšetření:

Výběr konkrétních vyšetřovacích metod určuje klinický genetik.

ODBĚR PLODOVÉ VODY

INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

- 1) odběr plodové vody (amniocentéza, AMC) – klasická 16.- 20. t.g.**
(punkce amniální tekutiny pod kontrolou UZ) 16-20 ml



počet odebraných ml
by měl odpovídat
týdnu gravidity

jsou analyzovány **amniocyty** (kožní **fibroblasty**, epiteloidní a fibroepiteloidní buňky) odloučené přímo z těla plodu (**buňky plodu**)



NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

PLODOVÁ VODA

INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

1) odběr plodové vody (PV) - amniocentéza, AMC

- funkce plodové vody:
- prostředí pro pohyb plodu
 - ochrana před vlivy zevního prostředí (nárazy, tlaky, zvuky)
 - reguluje teplotu plodu
 - polykání PV, vylučování moči – příprava trávicí soustavy na fungování po porodu
 - zdroj informací o plodu

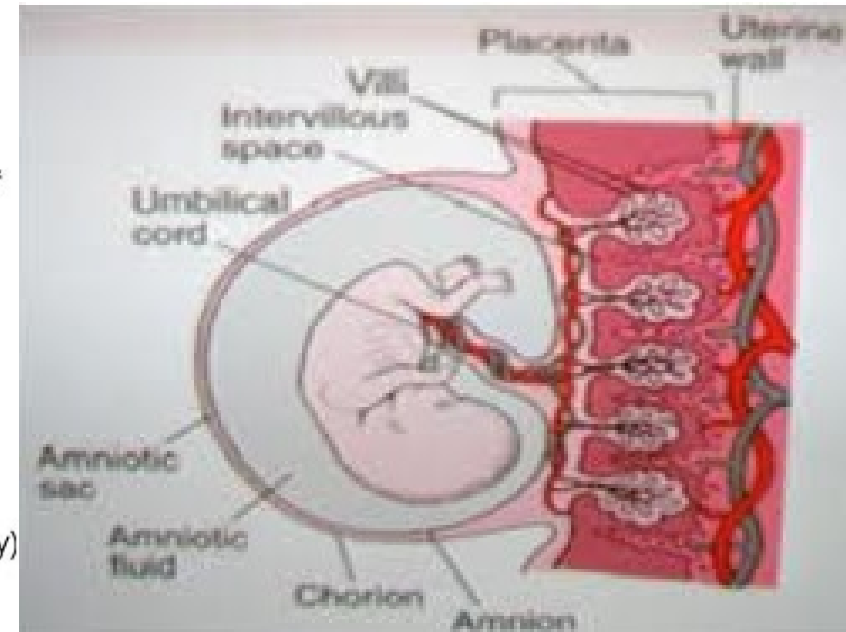
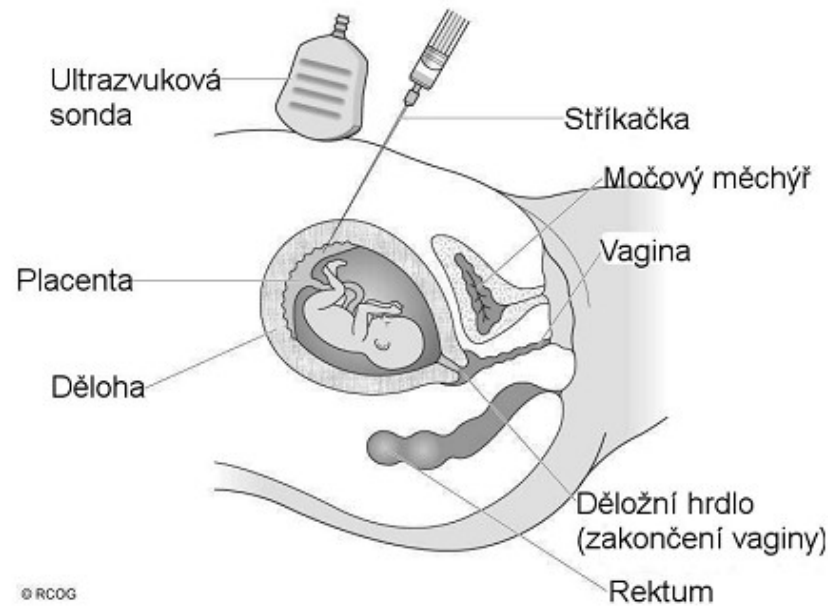
- složení plodové vody:
- je nažloutlá, při přenášení i nazelenalá
 - 99% voda
 - organické i anorganické látky – např. glukóza, bílkoviny, močovina, kreatinin, minerální látky, **buňky kůže** a gastrointestinálního traktu **plodu**



ODBĚR CHORIOVÝCH KLKŮ

INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

2) biopsie choriových klků (chorionic villi sampling, CVS) – 11. – 14.t.g.

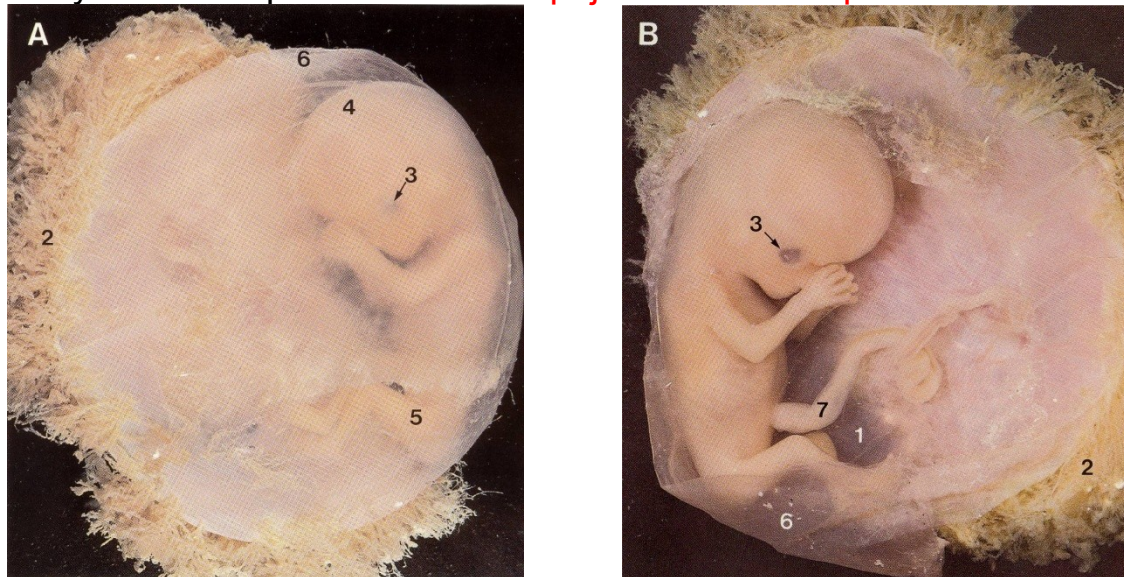


CHORIOVÉ KLKY

INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

2) biopsie choriových klků (chorionic villi sampling, CVS) –
extraembryonální tkáň

chorion – vnější obal kolem celého embrya, který se zvrásňuje do podoby klků,
odběr choriových klků se provádí **v místě spojení chorionu s placentou**



CHORIOVÉ KLKY

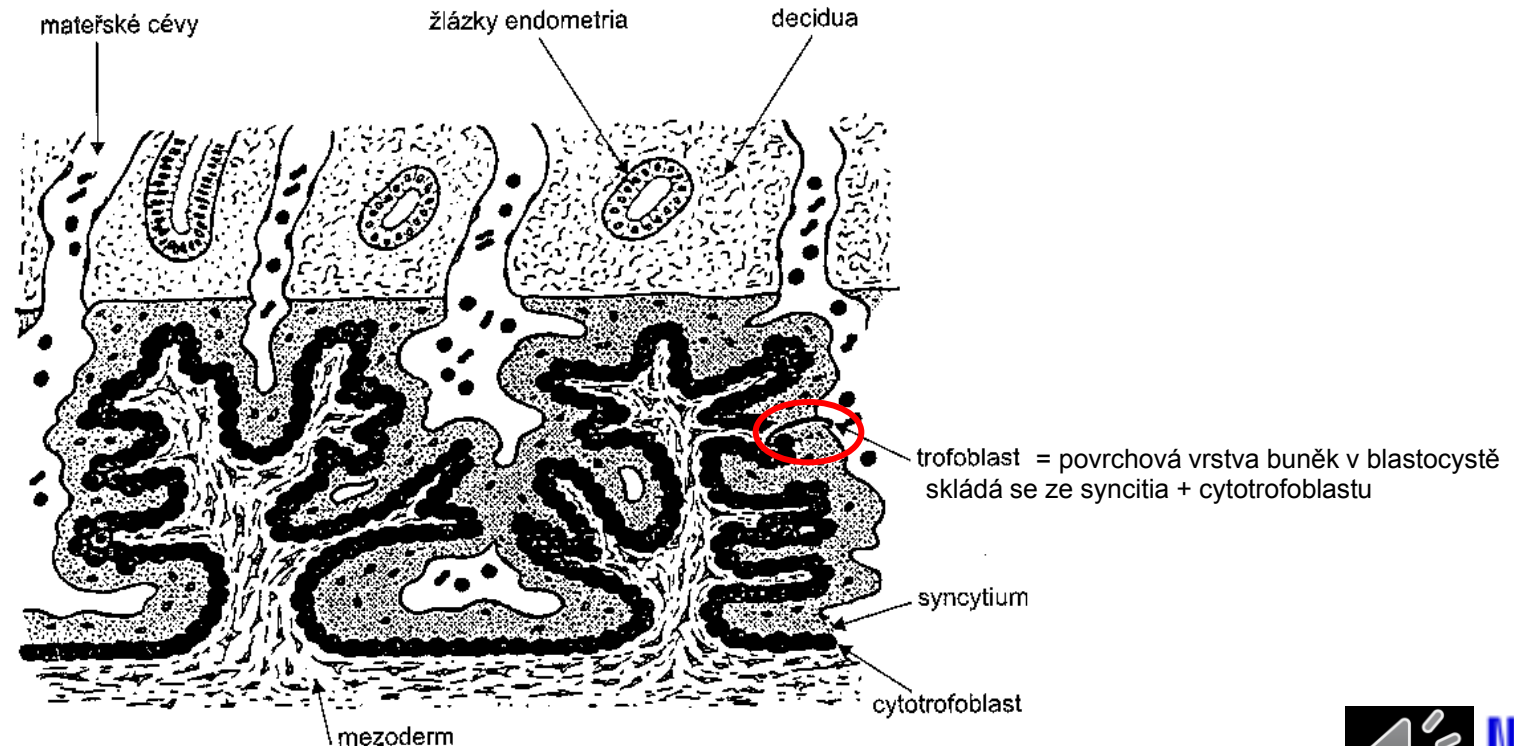
INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

2) biopsie choriových klků (chorionic villi sampling, CVS)

ve vývojové fázi blastocysty dochází k přichycení embrya k epitelu endometriální sliznice dělohy

povrchová vrstva buněk v blastocystě = trofoblast

chorion vzniká z trofoblastu



Choriový klk: topografické znázornění dvou vrstev trofoblastu; dle Garreye (13)



NI
D

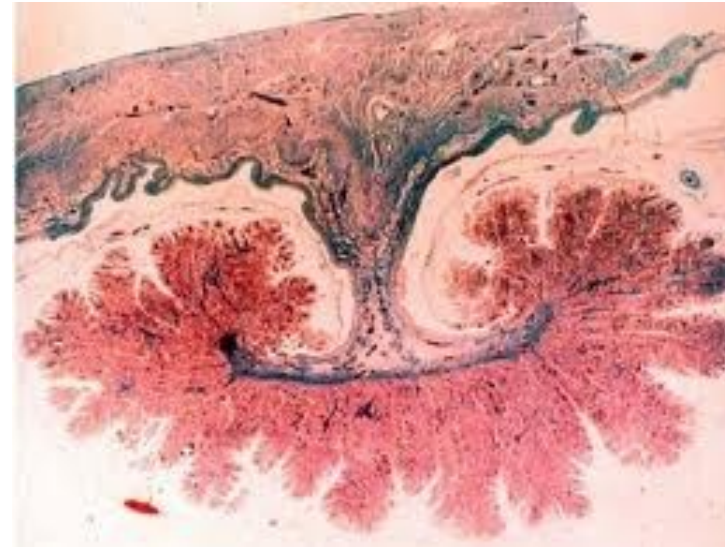
FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

CHORIOVÉ KLKY

INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

2) biopsie choriových klků (chorionic villi sampling, CVS)

funkce choriových klků – placenta vzniká ze stěny děložní sliznice zanořením choriových klků do děložní sliznice
- choriové klky zvyšují povrch plodového obalu chorionu, umožňují příjem výživných látek z matčiny krve



klky připomínají paroží vysoké zvěře



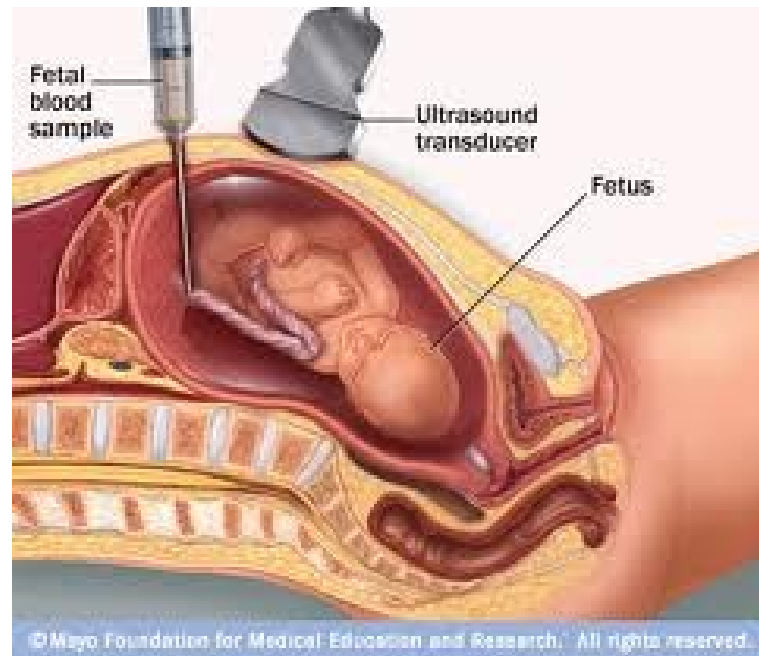
NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

ODBĚR KRVE PLODU

INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

- 3)** odběr krve plodu z pupečníku pod kontrolou UZ (kordocentéza, CC)
– po 20. t.g. – časová tíseň, ověření přítomnosti infekce (CMV – cytomegalovirus)



Prenatální molekulárně genetické vyšetření

INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

QF- PCR z DNA plodové vody nebo choriových klků

(Quantitative fluorescent polymerase chain reaction)

- výsledek 24 – 48 hodin
- kvantitativní fluorescenční PCR
- rychlá diagnostika nejčastějších aneuploidií autosomů a gonosomů – 21, 18, 13, X, Y, případně dalších souvisejících se SA (15, 16, 22)
- STR (Short Tandem Repeats) mikrosatelitní markery v intronech genů (2-6 bp, opakování 2 – 100x) na chromosomech, je analyzováno více STR markerů pro každý chromosom
- jedinci a alely různých genů se liší v počtu opakování STR
- délka fragmentu závisí na počtu STR opakování, množství produktu na množství templátové DNA – 2, 3 chromosomy, 1 chromosom
- PCR trvá až 4 hodiny, fluorescenčně značené primery – kapilární elektroforéza
- případnou kontaminaci krví matky lze touto metodou rozpoznat



NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÉ PRENATÁLNÍ VYŠETŘENÍ

INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

array- CGH

(Komparativní genomová hybridizace na čipu)

Výsledek do 3 dní

array – CGH – DNA čipy odhalí nebalancovaný genetický materiál

- odhalí o 5,2% patologických nálezů více než klasická cytogenetika
- DNA pacienta se hybridizuje na sklíčko, na kt. jsou naspotovány sondy o známé sekvenci – **odhalí nebalancovaný genet. materiál na všech chromosomech**
- **detekce malých změn**
- z AMC a CVS bez kultivace, tkáň potracených plodů (izolace DNA)
- potíže s interpretací nálezů – ne všechny souvisejí s postižením (polymorfismy bez fenotypového projevu - Copy Number Variation), nutné ověření nálezu u rodičů, ev. genotypovo-fenotypová korelace

Nelze zachytit – balancované přestavby

- polyploidie
- malé mozaiky menší než 10, 20%
- bodové mutace



NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Stanovení karyotypu plodu (ověření přítomnosti / nepřítomnosti VCA)

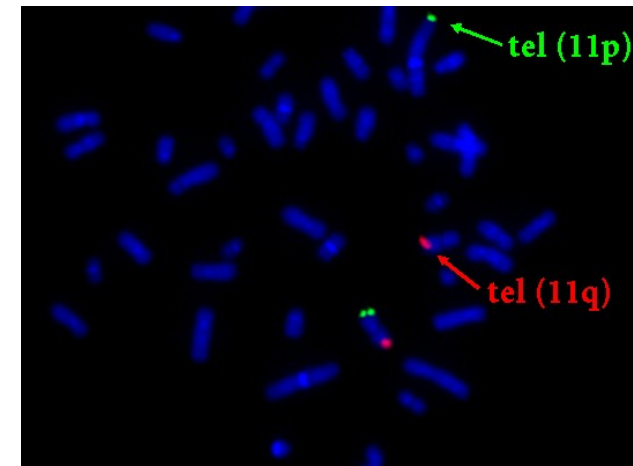
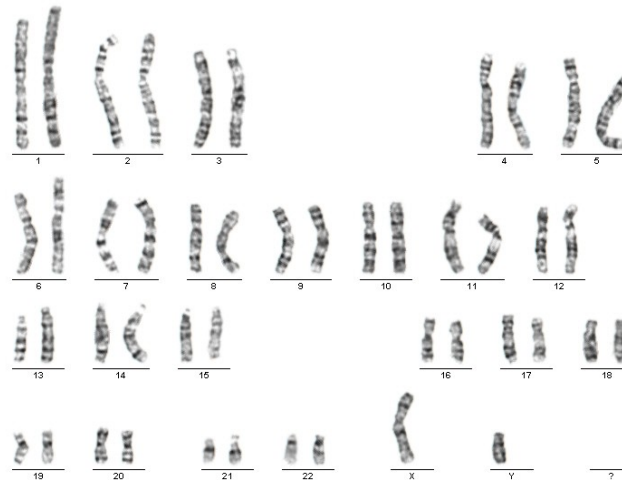
INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

délka kultivace plodové vody a choriových klků je přibližně 10 dnů

délka kultivace krve plodu z pupečníku je 72 hodin (jako u periferní krve)

STANOVENÍ KARYOTYPU (metodami klasické cytogenetiky)

+ následné potvrzení patologických nálezů metodou FISH (molekulární cytogenetika)



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) MOZAICISMUS – prenatální diagnostika

INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

AMC – odběr plodové vody

analýza buněk plodu

mozaicismus - přítomnost 2 nebo více buněčných linií ve vyšetřované tkáni, které se liší karyotypem - NE VŽDY SE JEDNÁ O PRAVÝ MOZAICISMUS

- přítomnost **pravého mozaicismu** u plodu (v těle plodu jsou přítomny 2 nebo více buněčných linií, jejichž karyotyp je odlišný) např. 47,XX,+21 [10] / 46,XX [20]
- riziko vzniku **pseudomozaiky kultivačního původu** (kultivační artefakt) (např. přítomnost nadbytečného chromosomu nebo strukturní přestavby v 1 mitóze)
vyloučení kultivačního artefaktu - kultivace 2 paralelních kultur z AMC
- opakovaný odběr (AMC, CVS)
- riziko **kontaminace mateřskou krví** při odběru - **po kultivaci nemohou** buňky mateřské krve **ovlivnit výsledek karyotypu plodu**, protože buňky mateřské krve se nenakultivují v médiu specifickém pro fibroblasty z kůže a sliznic plodu (amniocyty), (ale mohou **ovlivnit výsledek analýzy metodou PCR** – izolovaná DNA je směsí DNA kožních fibroblastů plodu a krevních buněk matky, proto při tomto typu vyšetření zařazujeme DNA matky jako jeden z kontrolních vzorků)
- riziko **kontaminace mateřskou tkání** při odběru – při používané technice odběru je minimální riziko kontaminace vzorku mateřskou tkání a kultivační médium je specifické pro amniocyty. Riziko, že nakultivujeme spolu s tkání plodu i tkáň matky je minimální.
- paralelně se stanovením karyotypu provádíme vyšetření QF-PCR



NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) MOZAICISMUS – prenatální diagnostika

INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

CVS - biopsie choriových klků (chorionic villi sampling)

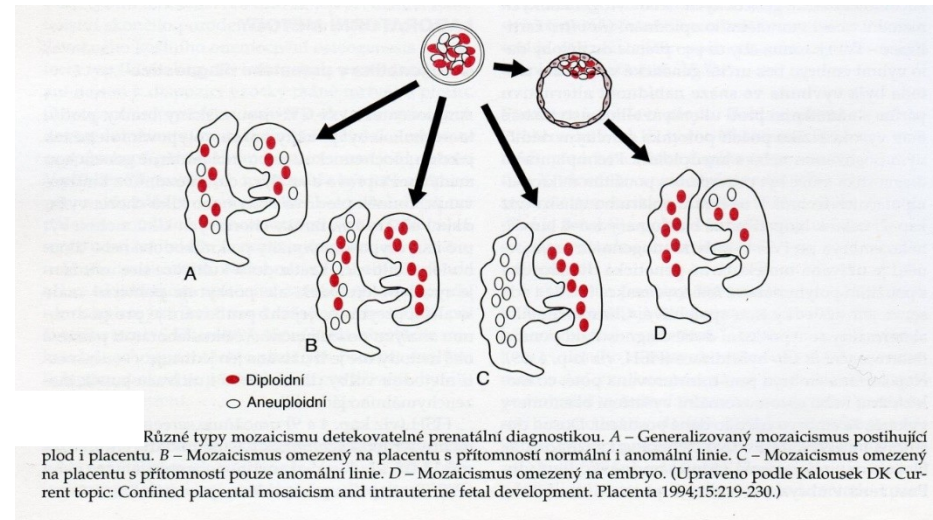
analýza extraembryonální tkáně (plodový obal chorion)

- riziko vzniku **pseudomozaiky kultivačního původu hrozí** u dlouhodobě kultivovaných vzorků (za dlouhodobou je považována délka kultivace +/- 10 dnů)
- **v dnešní době paralelně s vyšetřením karyotypu choriových klků vždy provádíme QF-PCR. Při tomto vyšetření srovnáváme výsledky z DNA choriových klků s DNA matky pro odhalení případné kontaminace mateřskou krví či tkání.**
 - při dlouhodobé kultivaci existuje riziko vzniku pseudomozaiky způsobené **kontaminací mateřskou tkání** (pouze u plodů ženského pohlaví, plod má stejné gonosomy jako matka, neodlišíme mitózy od matky a plodu) – prevence – pečlivé oddělení mateřské tkáně před kultivací
 - **kontaminace mateřskou krví pro cytogenetické vyšetření nevedí** (buňky krve se nenakultivují za podmínek kultivace choriových klků); pro molekulárně genetické vyšetření je kontaminace krví matky na závadu – izolujeme DNA současně z krve i klků – směs DNA plodu a matky.)



VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY (VCA) MOZAICISMUS – prenatální diagnostika

pravý mozaicismus – rozdílný karyotyp u embrya a v extraembryonální tkáni choriových klků
(kromě toho jak u plodu, tak v klcích, může být karyotyp s pravou mozaikou nebo bez mozaiky)



placentární mozaicismus – možný zdroj falešně pozitivních výsledků

- je možný rozdílný nález karyotypu embrya a extraembryonální tkáně
- riziko, že placenta má normální karyotyp a plod trisomii je minimální
- sporné nálezy jsou potvrzovány AMC

Přibližně 2% vyšetření vzorků z CVS přináší nejednoznačný výsledek v důsledku chromosomového mozaicismu (zahrnuje pravý mozaicismus a pseudomozaicismus). V těchto případech je pro potvrzení případné chromosomové aberace doporučeno indikovat AMC.



NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

METODY INVAZIVNÍ PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

rizika invazivních metod: - odtok PV po AMC
- klasická AMC, CVS, CC – 0,3 - 0,5% riziko odtoku PV a abortu (u abortu do 2 týdnů po odběru je uvažováno o souvislosti s AMC, CVS, CC)

Hodnoty rizika jsou orientační:

- zkušenost lékaře odebírajícího materiál
- míra sledování zdravotního stavu těhotné a plodu (včasným podchycením případných komplikací lze předejít abortu)

klasická cytogenetika – délka trvání vyšetření:

AMC - výsledek za 2 -3 týdny

CVS – 2 – 3 týdny (dlouhodobá kultivace)

CC – výsledek do týdne

molekulární genetiky – délka trvání vyšetření:

QF-PCR – za 24 – 48 hodin



NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

FETÁLNÍ TERAPIE

není běžným postupem v souvislosti s dědičnými chorobami plodu

UPT (umělé přerušování těhotenství) z genetické indikace

Ukončení gravidity pro VVV z genetické indikace je možné do **24. t.g.**

- interrupce – do 12.t.g.
- indukce abortu později

Pozdní záchyt VV (po 24. t.g.) – mezioborová komise – gynekolog,
odborný lékař (vada plodu), genetik,
psycholog – ve výjimečných případech
UPT i později
- individuální poradenství



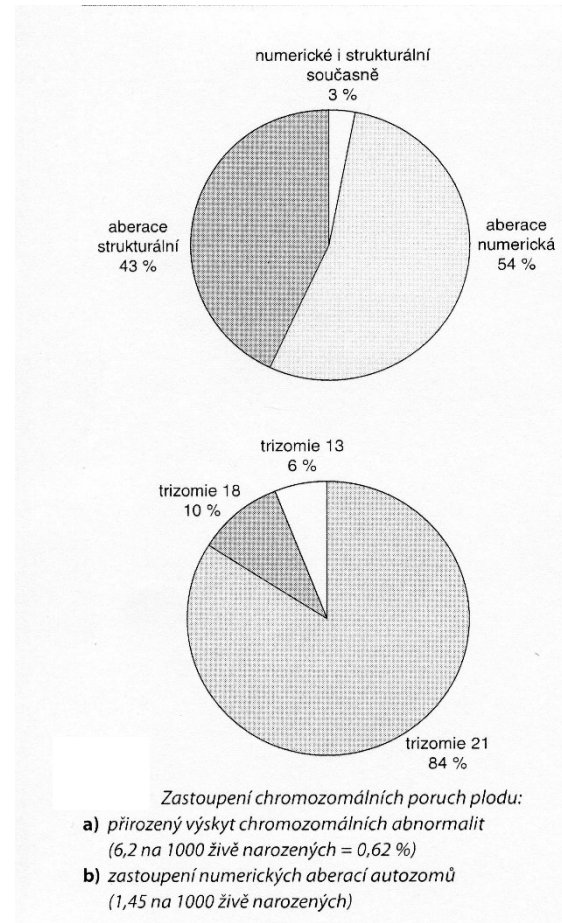
VROZENÉ CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY U PLODU



NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Zastoupení chromosomových změn plodů



CHROMOSOMOVÉ ABNORMALITY

- **vrozené chromosomové abnormality (VCA)** – viz prezentace „vrozené chromosomové abnormality“

vyšetření konstitučního karyotypu – početní

- strukturní

Kterákoli abnormalita může být přítomna i v mozaice, ale prenatální záchyt mozaiek není příliš častý.



NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÉ TESTOVÁNÍ embryí (asistovaná reprodukce)

- PGT-A: preimplantační genetické testování **aneuploidií**
(dříve PGS – preimplantační genetický screening)
- PGT-M: preimplantační genetické testování **monogenních chorob**
(dříve PGD – preimplantační genetická diagnostika)
- PGT-SR: preimplantační genetické testování **strukturních chromosomových přestaveb**
(structural rearrangement)
(dříve PGD – preimplantační genetická diagnostika)

PGT-A: array-CGH, MPS (masivně paralelní sekvenování)

PGT-M: MPS

PGT-SR: MPS, SNP array (Karyomapping)

Karyomapping – metoda umožňuje nepřímou DNA diagnostiku pro všechny lokusy lidského genomu. Podstatou je propojení SNP markerů s hledanou mutací. Lze detekovat aneuploidie i mutace v genu. Porovnáváme SNP profily rodičů a embrya.



NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÉ TESTOVÁNÍ embryí (asistovaná reprodukce)

- analýza několika buněk 5 - 6 denního embrya = blastocysty (odběr trofektodermu), v některých případech odběr buněk (blastomer) z 3 denního embrya
- možnost detekce genetických abnormalit embrya – aneuploidie chromosomů, detekce nebalancovaného genetického materiálu u embryí nosičů balancované přestavby, analýza mutací v genech (monogenní choroby)
- do dělohy matky je implantováno embryo bez genetické zátěže
- zvýšení pravděpodobnosti úspěšného těhotenství a narození zdravého dítěte
- vyšetření je možné doplnit vyšetřením z plodové vody
- není vyloučena jiná genetická vada než ta, která je vyšetřena



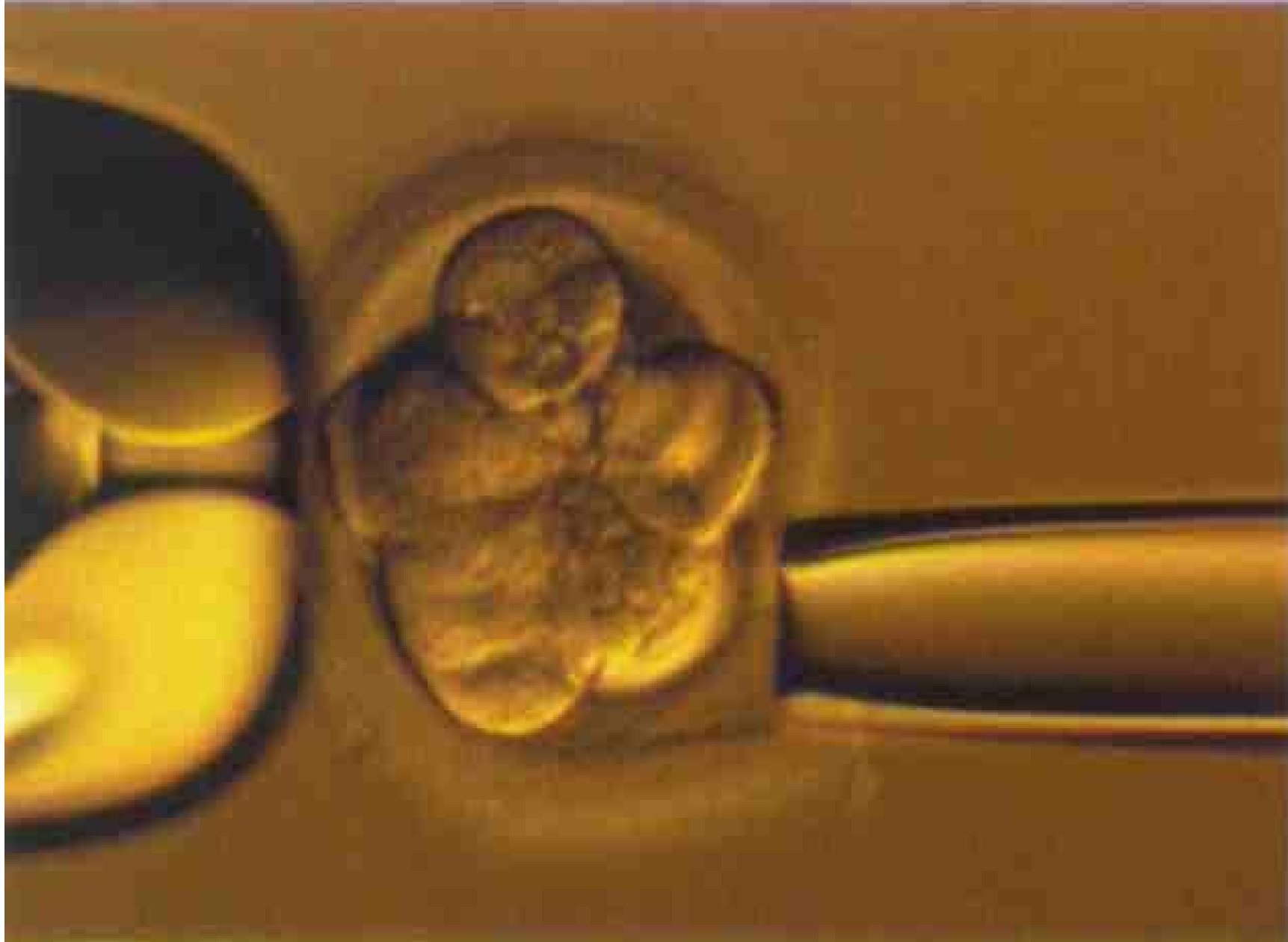


NI
D



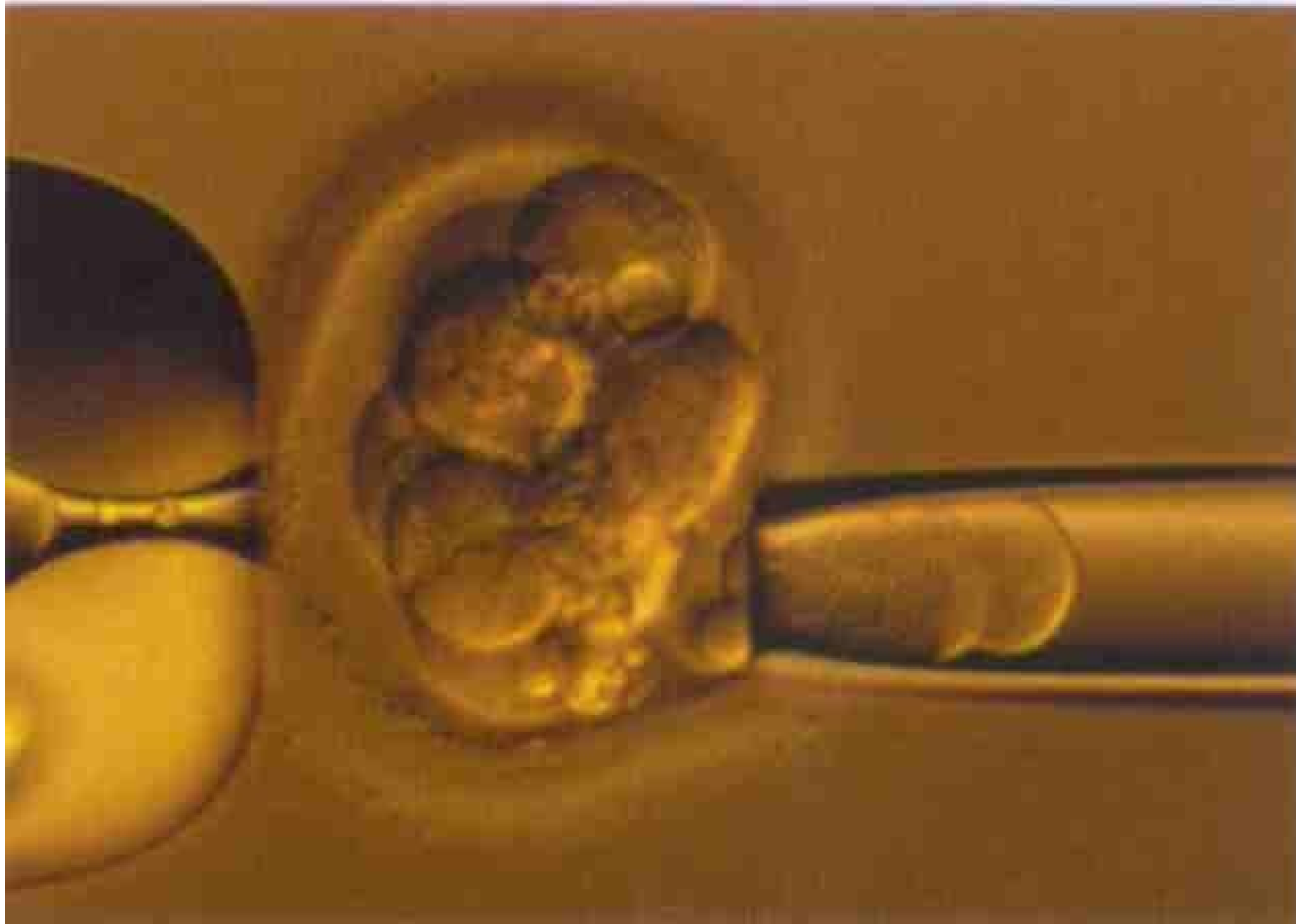
NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO



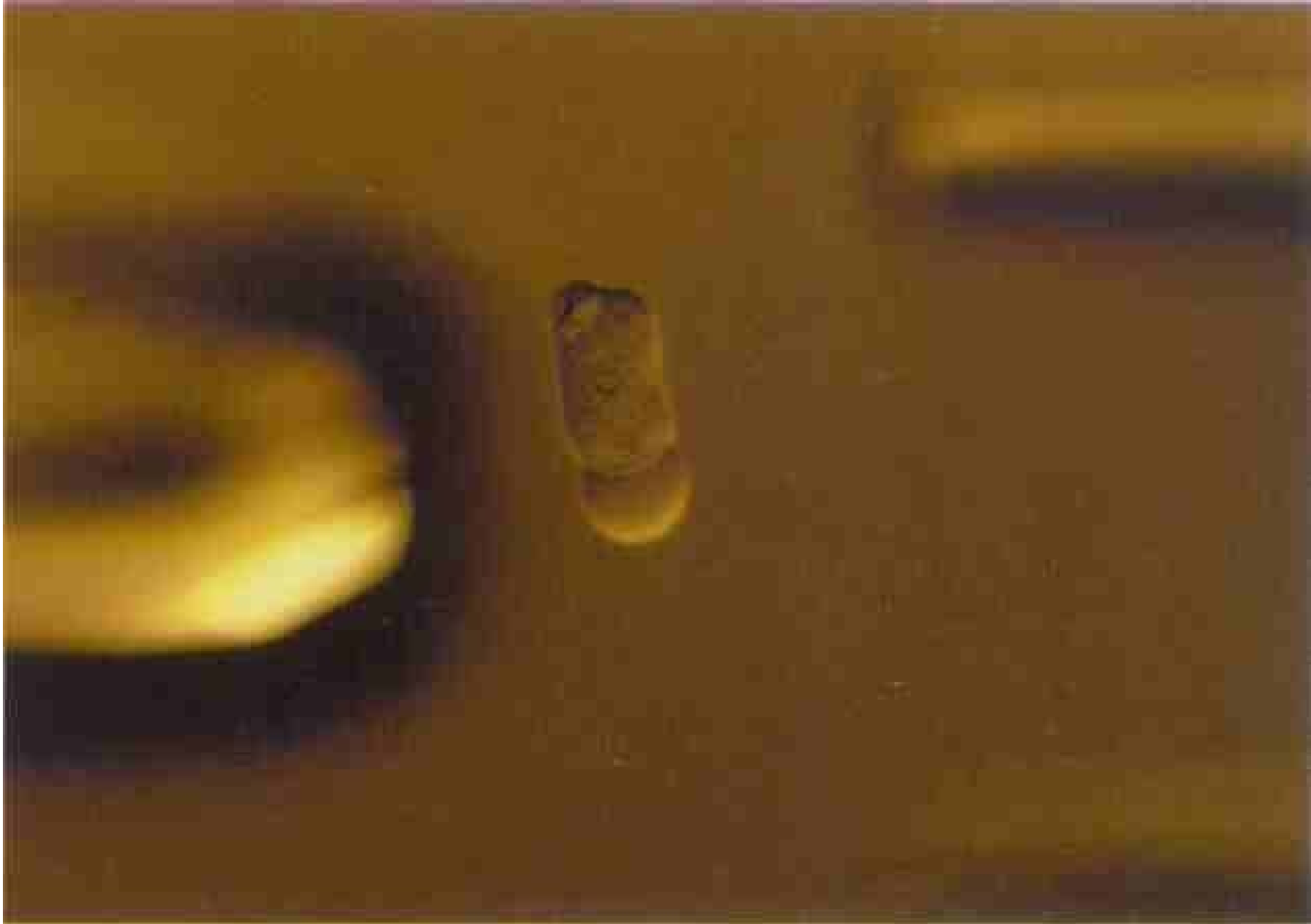
NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO



NI
D

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO



NI
D

Obsah prezentace je v souladu s aktuálními
doporučeními Společnosti lékařské genetiky a genomiky
ČLS JEP (www.slg.cz)

Kontakt pro dotazy: Navarikova.Marta@fnbrno.cz