



Prenatální diagnostika

Oddělení lékařské genetiky

FN Brno



Prenatální diagnostika

Historie

AMC 1966 (Steel a Breg) cytogenetika bez UZ

UZ zavedení zač. 70. let, rutinní vyš. II. pol. 70.

CVS 1981, Brambati, Simoni
placentocentéza 1986 diagnostická metoda
časná AMC konec 80.

Detekce fetálních buněk v mateřské krvi 90.léta
Preimplantační diagnostika
(experimentální)

Úroveň v ČR, záchyty (VVV, VCA), WHO hodnocení

Metody prenatální diagnostiky

I. neinvazivní = screeningové

UZ vyšetření

biochemické markery v MS

II. invazivní = cílené - ženy z geneticky rizikových skupin

AMC klasická, časná

CVS časné, pozdní

kordocentéza

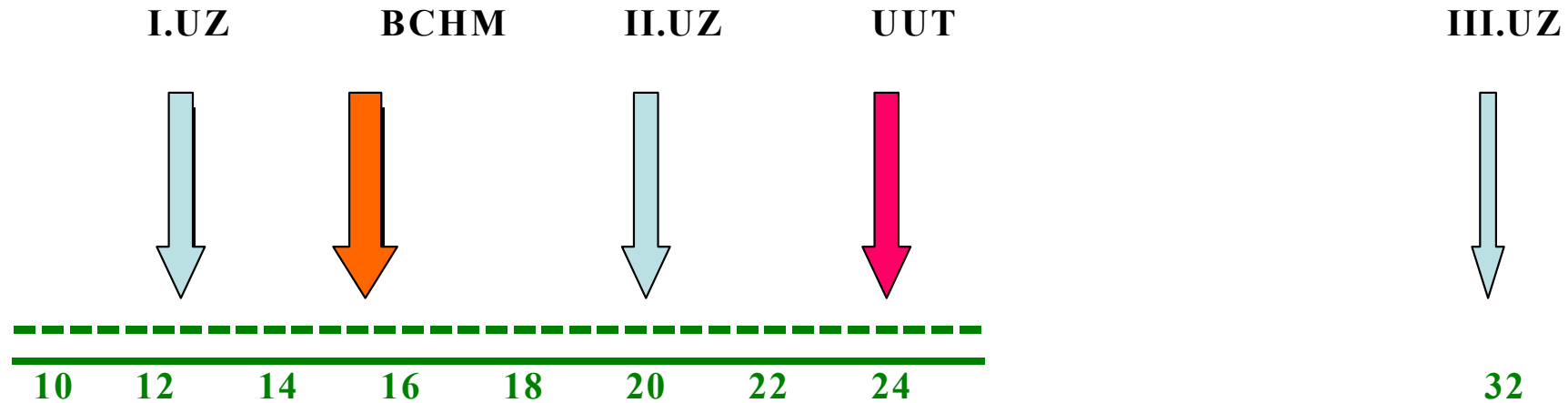
fetoskopie

III. speciální: detekce fetálních buněk v krvi matky

preimplantační diagnostika

Prenatal diagnosis

noninvasive methods



CVS

AMC

early AMC

cordocentesis

invasive methods

Neinvazivní metody metody

UZ vyšetření=metoda screeningová

Význam: vyhledávání VVV a VSV

třífázový UZ screening

- I. 13. t.g. přesné gestační stáří, VVV, některé VSV, počet plodů
- II. 20. t.g. VVV, VSV !!!
- III. 32. -34. t.g. růstová retardace, hypotrofie plodu, hydrocephalus, poloha plodu a placenty

dvoufázový UZ screening

- I. 20. t.g. VVV, VSV
- II. 34. t.g. viz. třífázový scr.

UZ markery chromosomových aberací

hypotrofie plodu X, 3n	19%	+13,+18,-
anomálie moč. ústrojí	20%	
defekty břišní stěny	50%	+18
srdeční vady	30%	+21
nehemolyt. hydrops	30%	
hygroma coli cysticum	80%	-X
pleurální výpotek	30%	
hydrocephalus	25%	
časná růstová retardace !!!!!		+18,+13, 3n, 4n

Screening biochemických markerů ze séra matky

Vyhledávání aneuploidií u plodů !

Podmínka - přesná délka gravidity !!!!

II. trimestr: **AFP** α -1-fetoprotein

hCG lidský choriový gonadotropin

SP1 trofoblast specifický β 1 globulin

uE3 nekonjugovaný estriol

I. trimestr: **PAPP-A** pregnancy associated plasma protein A

β -hCG podjednotka hCG

β -core hCG v moči

Vyšetření v I. trimestru

PAPP-A pregnancy associated plasma protein A

Diagnosticky významný v I. trimestru

pod 0,4 MoM: +21(záchyt až 44%), +18 a +13 (až 89%)

využití:

pro +21 citlivější v I. trim. než AFP ve II. trimestru

nepoužitelný ve II. trimestru

termín odběru 8. - 12. t.g.

Rezervy v prenatálním screeningu:

důsledné provádění, normy, akreditace bioch.lab. ,

vysoce special. UZ, informovanost široké odborné i

laické veřejnosti, úzká spolupráce s gynekology

Vyšetření ve II.trimestru

AFP α -1-fetoprotein

Glykoprotein produkovaný žl. váčkem, fetálními játry a střevem, funkce neznámá

max. produkce 12.-14. t.g. - v MS maximum ve 30.t.g.

po porodu prudký pokles

II.trimestr: AFP 2,5 MoM - rozštěpové vady (záchyt 95-98%)

0,5 MoM - aneuploidie

+21,+18,+13,+8,+9,-X

I.trimestr: pro rozštěpové vady - nepoužitelný

pro aneuploidie - nepoužitelný

Závěr: nízká hladina - aneuploidie

vysoká hlad. - rozštěpové vady

hypotrofie plodu

odumření plodu

hCG- lidský choriový gonadotropin

Glykoprotein produkováný trofoblastem-chorion-placenta

Funkce - udržování činnosti žlutého tělíska

podjednotka α - identická s ost. peptid. hormony(92 AK)

lab. t. β -spec. biolog. aktivita, termolabilní, při se zvyšuje hladina (145 AK)

hCG v MS- maximum v 10.t.g., pokles ve II. trim., setrvalá

hladina do porodu

II. trim.screening: nad 2,0 MoM - aneuploidie

pod 0,5 MoM - nepříznivá prognóza pro plod, +18

I. trim.screening: β hCG v 10.-12.t.g. průkaznější pro

uE3 nekonjugovaný estriol

Detekce v MS, vzniká z estriolu, produkce placentou z maternálních substrátů (cholesterol)

norm. hladiny 0,5-2,0 MoM

II.trim.: pod 0,5MoM - aneuploidie (+21)

I.trim.: “ jen pro +21, pro ostatní VCA nepotvrz.

SP1 trofoblast specifický β -1-globulin

produkce syncytiotrofoblastem, ovlivněna změnami epitelu

placentárních klků

diagnosticky významný v 5.-9. a 14.-20. t.g.

II. trim.: pod 0,5 MoM - intrauterinní růst. retardace, +18
nad 2,0 MoM - +21

Shrnutí screeningu aneuploidních plodů

Podmínka: měření BCHM v MS - **přesná délka gravidity!!**

Využití: vyhledávání plodů s aneuploidií

II. trimestr: snižená hl. AFP, uE3
zvýšená hl. hCG, **SP1**

rutinní vyšetření, normy

I. trimestr: není screening !!!

snížená hl. PAPP-A

zvýšená hl. β hCG, β core hCG v moči

kombinace 3 markerů ve II. trimestru - záchyt až 75%

kombinace 2 markerů v I. trimestru - 65%

Invazivní metody

Indikace k prenatálnímu cytogenetickému vyšetření

Geneticky rizikové skupiny=vyšší riziko narození dítěte s VCA

- 1. Věk matky: 35 let v roce porodu, pod 18 let
otce: 45 -55 let, součet věku obou rodičů: 70 let
!!!**
- 2. Patologické hodnoty biochemických markerů v MS**
- 3. VVV nalezené na UZ (30% podmíněno VCA)**
- 4. Balancované VCA u rodičů (nosiči 1/400)**

Méně časté - neméně důležité

**výskyt VCA v rodině, předchozí porod dítěte s VCA,
familiární sklon k nondisjunkci, ZCA (teratogeny,
rizikové prostředí), po IVF**

AMC=amniocentéza

Aspirace plodové vody(PV) pod kontrolou UZ, riziko výkonu 0,5%

klasická: odběr 16.-18. t.g. 20ml (převažuje)

časná: odběr 12.-14. t.g. 12-14 ml

Původ amniocytů v PV: kůže, respirační, gastrointestinální, urogenitální trakt, pupečník, plodové obaly

4-6% bb kultivableschopných

vyšetření: cytogenetické, biochemické, molekulárně gen.

Kultivace: 2 paralelní kultury → mozaiky x pseudomozaiky

kontaminace PV: mateřskou krví, fibroblasty

Frekvence výskytu m. Down v populaci

1/800 průměr ve všech věkových kategoriích

výskyt v závislosti na věku matky

20-24 let 1/1500

25-29 1/1050

35 let 1/350

38 1/160

40 1/70

42 1/30

44 1/13



Záchyt trisomie chromozomu 21 1993 - 2002

Rok	+21 prenatalně	+21 postnatálně	Prenat. záchyt %
1993	12	10	55
1994	4	20	17
1995	7	16	30
1996	12	10	55
1997	12	12	50
1998	16	6	73
1999	17	8	68
2000	15	9	63
2001	9 + 9	10	64
2002	8 + 5	14	48 !

Kordocentéza

Odběr po 20. t.g. transabdominálně pod kontrolou UZ
podmínka - **stanovení fetálního hemoglobinu (HbF) !!!**

Indikace:

stanovení karyotypu v časové tísni

Fra-X

nález mozaiky v PV

**hemoglobinopatie: thalasemie, srpková anemie,
hemofilie**

metabolické poruchy: (200 vrozených)

**stanovení hormonálních hladin (17-OH-progesteron,
kongenitální hypothyreosa,...)**

fetální infekce: toxoplasmoza, CMV, rubeola

**komplikace: SA, fetální krvácení, amnionitida, arteriální
vazospasmus**

Fetoskopie

Přímá aspekce plodu fetoskopem,
transabdominálně, celková anestezie

indikace: sy. provázené malformacemi končetin,
orofaciální malf., genodermatozy

náhrada detailním UZ

komplikace: SA(4%), intrauter.infekce(2%),
předčasný porod(10%), opakování (4%)

Uniparentální disomie(UD)=oba chr. v páru
původem od 1 rodiče

průkaz: mozaika v CVS→AMC 2n plod-ztráta
nadbyt.ch.

teoreticky 1/3 má oba chr. od 1 rodiče-mol.gen.
průkaz

CVS=biopsie choriových klků

Odběr transabdominální x transcervikální pod UZ kontrolou

riziko odběru 1% (0,5% jako AMC)

časné CVS: 10.-12.tg. (nižší tg. transverzální redukce končetin)

pozdní CVS: II. a III. trimestr (placentocentéza)

metoda přímá - 2 hod kultivace s kolch., zpracování

kultivační- krátkodobá, cytotrofoblast

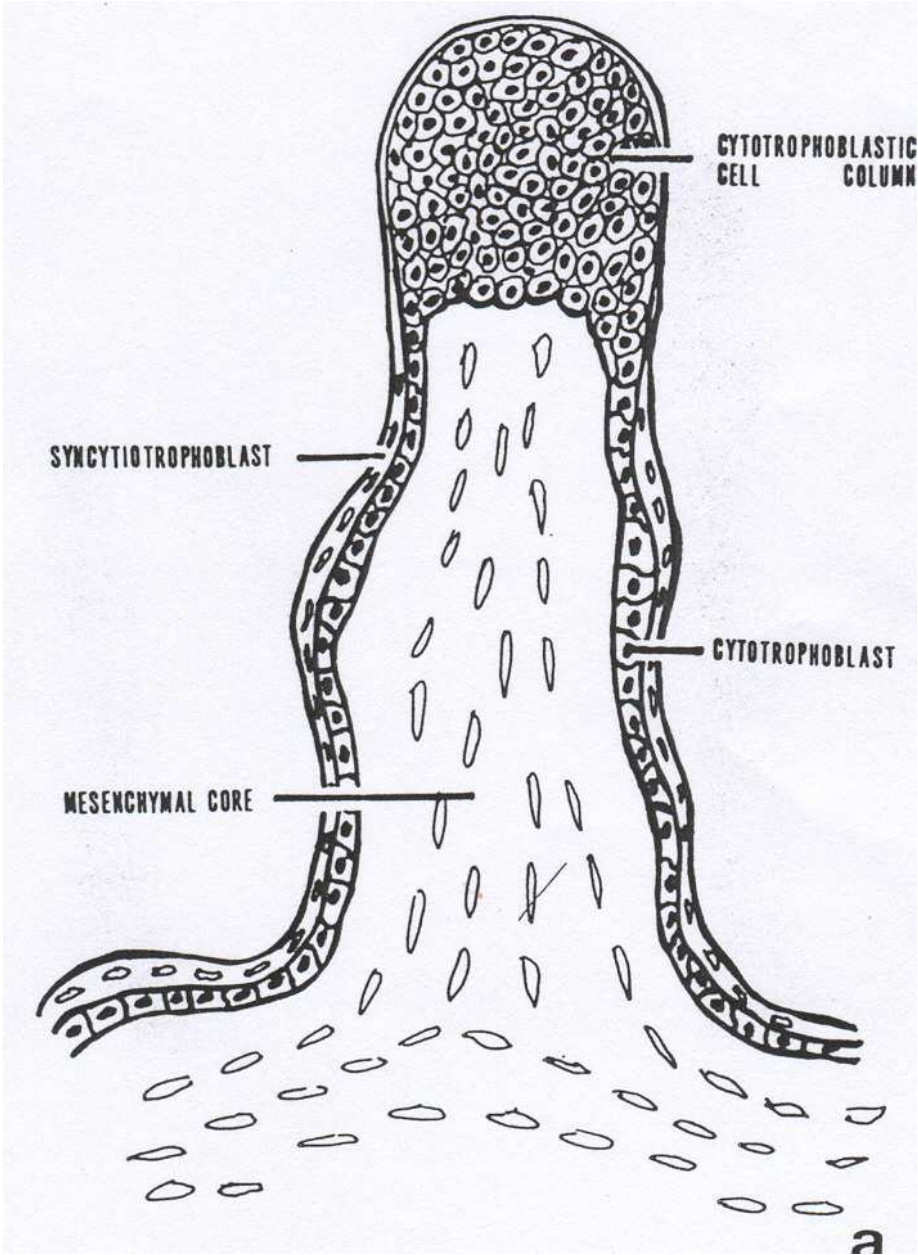
- dlouhodobá, mezench. stroma

otevřený systém, 5% CO₂

zpracování, barvení, hodnocení

nález mozaiky → AMC, kordocentéza (podle t.g.)

CVS



CVS - diskrepance v karyotypu

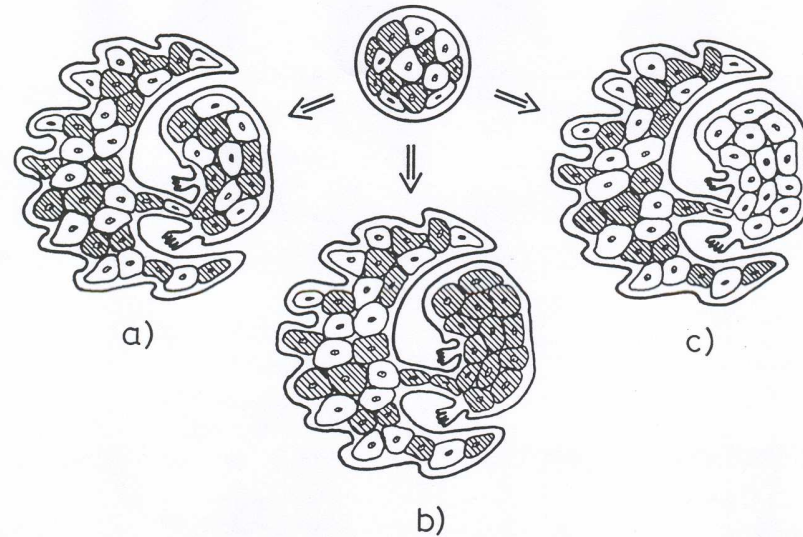
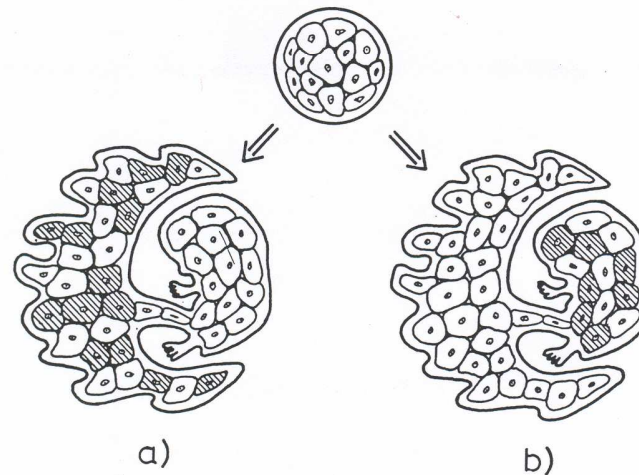


Fig. 1. Diagrammatic representation of the development of a mosaic morula resulting in a conceptus with chromosomal mosaicism involving both the chorion and the embryo; b, c conceptus with a nonmosaic embryo and mosaicism confined to the chorion



Placentární mozaicismus (CPM)

Zdroj falešně pozitivních a falešně negativních výsledků

Typy CPM podle lokalizace:

- I.** nejběžnější, aberace v cytotrofoblastu, neovlivní intrauterinní růst → **přímá** metoda kultivace
- II.** méně častý, aberace v mezenchymu, IUGR → **dlouhodobá** metoda kultivace
- III.** vzácný, aberace v **cytotrofoblastu i mezenchymu**, IUGR, SA

Mozaiky chromosomových aberací podle doby vzniku

Vznik postzygoticky

Fenotypový projev závisí na: typu chromosomu
distribuci abnorm. bb do tkání
stádiu vzniku (I., II.)

- I. vznik v blastocystě (před diferenciací) na embryo a extraembr. tkáň → mozaika přítomna v obou
- II. vznik v pozdějším stadiu (po diferenciaci) v embryu nebo v extraembr. tkáni, mitotická nondisjunkce a přestavby vznikají častěji v choriu (savčí embryo vzniká ze 3-4 bb blastocysty ve stadiu 64 bb., ostatní bb vytvoří extraemb.tk)

Abnormální linie častější v placentě !!

Mozaiky

Vznik postzygoticky

Fenotypový projev závisí na: typu chromozomu

distribuci abnorm. bb do tkání
stádiu vzniku

I. vznik v blastocystě před diferenciací na embryo a extraembr. tkáň → mozaika přítomna v obou

II. vznik v pozdějším stadiu v embryu nebo v extraembr. tk.

Abnormální linie častější v placentě !!

Hypotézy vzniku mozaiky a diskrepance v nálezech u embrya a v extraemb.tk.

1. Mitotická nondisjunkce a přestavby vznikají **častěji v choriu** (savčí embryo vzniká ze 3-4 bb blastocysty ve stadiu 64 bb. Ostatní bb vytvoří extraemb.tk)
2. Mitotické chyby vznikají **v obou tk**, embryo má kontrolní mechanismus limitující dělení abnormálních bb, v choriu se abnorm. buňky dělí - přetrvání VCA
3. Specifické abnormity mohou mít pozitivní vliv na buňky trofoblastu v **různých stadiích vývoje placenty** - změny jsou výhodné

Mozaiky - nálezy v prenatálních vyšetřeních

Představují **0,3%** všech prenatálních vyšetření

mozaiky **aneuploidií** **69,4%**

mozaiky **strukturních aberací** **30,6%**

autozomů **10,3%**

gonosomů **5%**

marker chrom. **15,3%**

rozlišení mezi pravou mozaikou a pseudomozaikou

řešení - doplňující vyšetření

CVS-časná AMC

AMC-opak. AMC, kordocentéza

Mozaiky - nálezy v prenatálních vyšetřeních

Představují **0,3%** všech prenatálních vyšetření

mozaiky **aneuploidií** **69,4%**

mozaiky **strukturních aberací** **30,6%**

autozomů **10,3%**

gonosomů **5%**

marker chrom. **15,3%**

rozlišení mezi pravou mozaikou a pseudomozaikou

řešení - doplňující vyšetření

CVS-časná AMC

AMC-opak. AMC, kordocentéza

Nález VCA - riziko postižení

Prenatální nález **de novo** balancované přestavby-riziko
postižení plodu

reciproké translokace 6,1%

robertsonovské transl. 3,7%

inverze 9,4%

nadpočetné marker chr.:

satelitní 10,9%

nesatelitní 14,7%

počítáno z cca 400 000 AMC

Integrovaný test v graviditě

Schéma

10. t.g. PAPP-A z MS



12. t.g. UZ měření NT větší než 3 mm → časná AMC



norm. nálezy PAPP-A i na UZ



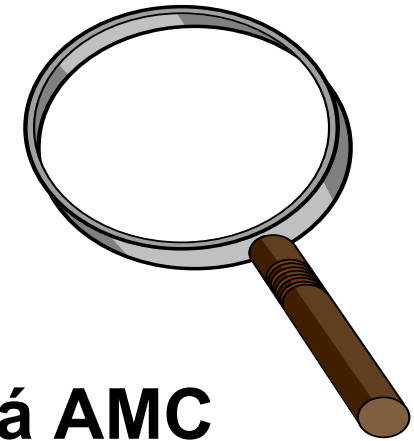
16.t.g. AFP, hCG - patologie → AMC



20.t.g. UZ zaměřené na VVV a VSV → AMC, kordocentéza



porod



Speciální metody

Detekce fetálních buněk v mateřské krvi

Fetální lymfocyty a granulocyty:

přežití až 27 let v mat. krvi a KD, odstranění protilátkami CD 45

Buňky trofoblastu:

cytotrof., syncytiotrof., průkaz spec. protilátkami (nízká specifita)

Jaderné fet. erytroblasty:

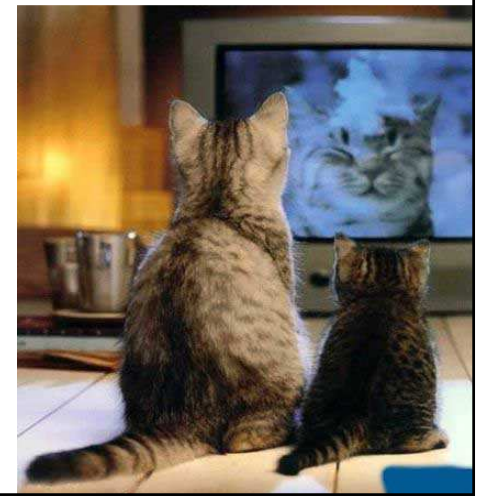
přežití 90 dnů, neusazují se v KD matky !!

Izolace:

použitím protilátek - HbE, HbF
centrifug. v hustotním gradientu

Využití:

mol. gen.vyšetření
FISH



Detekce fetálních buněk v mateřské krvi

Fetální lymfocyty a granulocyty:

**přežití až 27 let v mat. krvi a KD, odstranění
protilátkami CD 45**

Buňky trofoblastu:

**cytotrof., syncytiotrof., průkaz spec. protilátkami
(nízká specifita)**

Jaderné fet. erytroblasty:

přežití 90 dnů, neusazují se v KD matky !!

Izolace:

**použitím protilátek - HbE, HbF
centrifug. v hustotním gradientu**

Využití:

mol. gen.vyšetření

FISH

Jaderné fetální erytroblasty

Krátká doba životnosti - **90 dnů**

detekce po 8.tg., hustota cca 1/10 000

detekce Y u žen s plodem XX potvrdí resorpci plodu XY(gemini)

izolace: monoklon.protilátky (transferinové receptory CD 71, glykoforin A, trombospodin CD 36)

embryonální HbE (od 8.tg detekce v oběhu matky)

mikromanipulace (po izolaci v hustotním gradientu)

kultivace izolovaných fetálních bb. ???

! Preferenčně přecházejí do oběhu matky aneuploidní bb.!

Využití: cytogenetika – FISH (aneuploidie)

molekul. gen. - CF, DMD

Preimplantační genetická diagnostika

Materiál: spermie, oocyty, polární tělíska, blastomery

**1. Vyšetření spermií: mol. gen. a cytogenetické, význam-
odhad genové a chromosomové mozaiky (FISH-poruchy v
meioze typu nulisomie, disomie, polysomie)**

zvýšený výskyt VCA: po cytostatické léčbě

u párů s poruchami reprodukce (mozaiky aneuploidie gonosomů),

po ICSI (VCA gonosomů, +13, +18),

průměr v populaci: 0,09-0,12% spermií

2. Oocyty: aneuploidie roste s věkem,

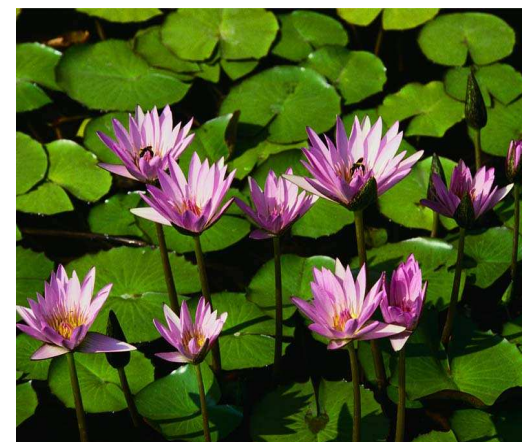
průměr v populaci: disomie 21 v 0,4% oocytů

Přirozená selekce patolog. embryí!!!!

preimplantační fáze - 27% embryí nese VCA

I.trimestr - 15% VCA

novorozenci - 0,6% VCA



Vyšetření blastomer

IVF !! analýza blastomery ve stádiu 6-8 buněk, odběr 1-2 bb,
implantace nepostiženého plodu

Vyšetření: aneuploidie

FISH CEP (21, 18, 13, 16, X, Y), aneuploidie – mozaiky !

X/Y – volba pohlaví (těžké X recesivní choroby) **V** rizikových
rodinách

Kvantitativní fluorescenční QF-PCR (aneuploidie)

Monogenní choroby:

**Detekce monogenních chorob – cystická fibroza mol.gen .detekce
nejčastějších mutací**

Strukturní aberace: znalost bal. t u rodičů

Použití známých sond (např. Rob t)

Příprava specifických sond

ICSI

Intracytoplasmatická injekce spermií

Zvýšený výskyt závažných VVV – nepotvrzen

Zvýšený výskyt VCA !!!! 1,5% x 0,6% norm. populace

Převážně aberace X a Y (také 13, 18)

CFTR

**Nutno vyšetřit mutace CFTR genu u embryí po ICSI u mužů se
syndromem kongenitální absence vas deferens**

**ΔF508 – zvýšený výskyt u mužů s poruchami reprodukce
(neobstrukční azoospermie, těžká oligospermie)**