

Invazivní metody prenatální diagnostiky

MUDr. Pavel Vlašín

Centrum prenatální diagnostiky, s. r. o., Veveří 39, 602 00 Brno

E-mail: vlasin@prenatal.cz

K čemu slouží prenatální diagnostika?

Invazivní prenatální diagnostika umožňuje vyšetření některých genetických onemocnění plodu již před porodem.

Dle Caldy¹ jde o „poskytnutí úplné informace rodičovskému páru, zbavit jej neopodstatněných obav souvisejících s reprodukcí, umožnit aktivní plánování těhotenství, minimalizovat riziko narození postiženého dítěte a umožnit optimální a časnou postnatální léčbu plodu na základě stanovení včasné diagnózy“.

Indikací k tomuto vyšetření je potvrzení nebo vyloučení rizika, které bylo stanoveno na základě anamnézy nebo screeningových testů. Základním obecným pravidlem, kterým se řídíme při indikaci tohoto vyšetření, je, že riziko komplikací invazivního zákroku musí být nižší než riziko onemocnění plodu.

Tj. pokud je riziko komplikací při odběru plodové vody např. 1 : 300 (0,3 %) a riziko Downova syndromu 1 : 100, je provedení invazivního vyšetření u nekomplikovaného těhotenství indikováno. Pokud je riziko invazivního zákroku zvýšené (krvácení v graviditě, hrozící předčasný porod, ...), je nutné toto brát v úvahu a zvážit individuální rizika, spojená s tímto vyšetřením.

Dle zákona č. 373/2011 Sb., o specifických zdravotních službách, je nezbytnou součástí tohoto vyšetření konzultace před vlastním provedením – pohovor s rodiči a jejich zevrubné poučení o tomto výkonu i o rizicích spojených s tímto vyšetřením. Výsledkem tohoto pohovoru je podpis informovaného souhlasu rodičů s výkonem a s genetickým vyšetřením plodu, resp. i souhlas s uschováním zálohy DNA k pozdějšímu vyšetření či výzkumným účelům.

Standardní součástí vyšetření je i poučení o možných komplikacích a vyplnění protokolu o odběru, kde uvádíme indikaci, stáří gravidity, počet punkcí, operátéra a ev. komplikace.

Před provedením invazivního zákroku je nutné pečlivě ultrazvukové vyšetření. Při něm se hodnotí gestační stáří, uložení placenty, množství plodové vody, pohlaví plodu a poznatelné markery chromozomálních aberací. Je nutné, pečlivě vybrat optimální místo pro punkci. Někdy je vhodné, při špatných technických podmínkách (obezita pacientky, menší množství plodové vody) nebo nespolupracující pacientce, výkon odložit.

U Rh negativních pacientek je potřeba důsledně dbát na profylaxi isoimunizace matky anti-D gamaglobulinem.

K nejčastějším indikacím patří:

- věk matky nad 35 let,
- pozitivní výsledek screeningových testů na přítomnost chromozomální aberace u plodu,
- nález ultrazvukových známek chromozomální aberace, vývojové vady plodu,
- postižené dítě v rodině (pozitivní rodinná anamnéza),
- přítomnost známého genetického onemocnění v rodině.

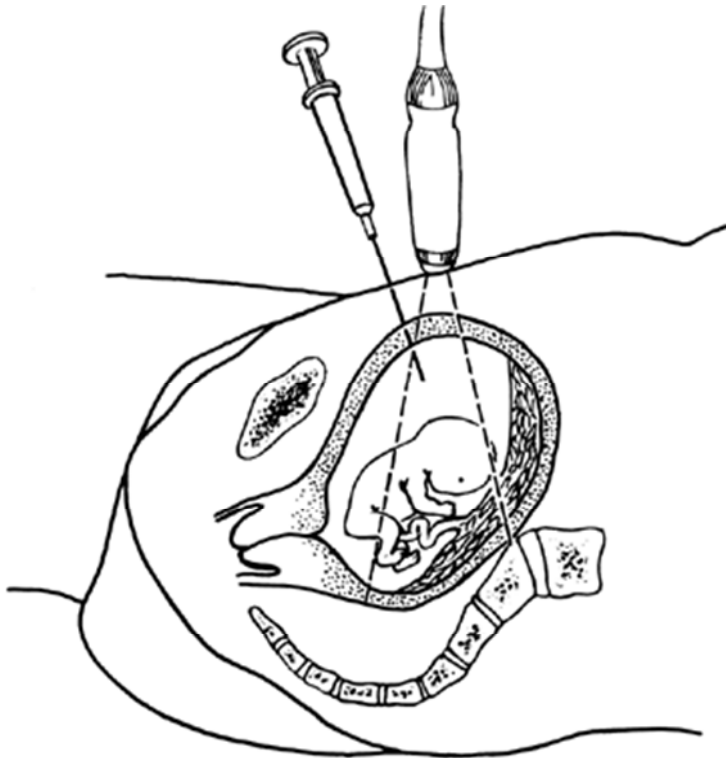
Vyšetření není vhodné provádět u pacientek s:

- vysokým rizikem spontánního abortu (krvácení, tonizace dělohy, inkompetence hrdla,
- nepříznivou porodnickou anamnézou – sterilita, opakované těhotenské ztráty,
- akutní onemocnění matky, viróza, kožní infekce, ...

**Invazivní vyšetření:
Odběr plodové vody – Amniocentéza²**

Princip vyšetření:

Punkcí amniální dutiny získáme buňky plodu a plodových obalů. Po jejich kultivaci a laboratorní přípravě lze u nich zjistit počet a tvar chromozomů. Výsledek je k dispozici za 12–14 dnů.



Simpson, JL, Elias, S. Prenatal diagnosis of genetic disorders. In: Creasy RK, Resnik R [eds.]: Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice. Philadelphia, WB Saunders, 1994, p. 61.

Provedení vyšetření:

Výkon plánujeme po 16. týdnu gravidity.

Po ultrazukovém vyšetření a stanovení biometrie, množství plodové vody a uložení placenty vybíráme místo vpichu. Při ultrazukovém vyšetření se snažíme i o stanovení pohlaví plodu. Důvodem je vyloučení záměny vzorků i diagnóza ev. anomálií vývoje genitálu (hypospadie, syndrom testikulární feminizace, ...).

Vždy preferujeme místo co nejbližší fundu a ve střední čáře. Dáváme pozor, aby mezi stěnou břišní a dělohou nebyla interponována střevní klička. Je-li to možné, vyhýbáme se placentě. Pokud toto nelze, volíme místo mimo inzerci pupečnicku na placentě. Místo vpichu si vždy před zavedením jehly ověříme stlačením břišní stěny prstem, přičemž i odhadujeme vhodný úhel, pod kterým provedeme punkci. Lokální anestezie není nutná.

Pod kontrolou ultrazvuku je přes břišní stěnu zavedena do amniální dutiny jehla ke spinální anestezii bez mandrenu (21–22 Gauge), kterou je odebráno malé množství plodové vody (cca 15–25 ml). Jedná se o cca 10 % z celkového objemu plodové vody (200 ml). Toto množství se obnoví do druhého dne od odběru. Během celého zákroku kontrolujeme průnik hrotu jehly ultrazvukem. První 2–3 ml plodové vody, vzhledem k možné kontaminaci mateřskými buňkami, do laboratoře neposíláme.

Zvláštní kapitolou je odběr plodové vody u vícečetného těhotenství. Obecně je doporučován odběr od obou plodů i u monozygotních monochoriálních dvojčat k vyloučení ev. mozaiky jednoho plodu (i když toto je velmi raritní). Před odběrem je nezbytné velmi pečlivé ultrazukové vyšetření zkušeným sonografistou s jasnou představou o umístění amniálního septa. Je třeba minimalizovat možnost opakované punkce vaku blan od stejného plodu. Variantou, která to vylučuje, je punkce obou amniálních dutin z jednoho vpichu, ev. dříve používané zbarvení jednoho vaku blan metylénovou modří. (cave – tato při vylučování zbarví druhý den po odběru i moč matky).

Po zákroku kontrolujeme akci srdeční plodu, pacientka zůstává cca 30 minut v odpočinkové místnosti. Bolestivost výkonu lze přirovnat k odběru krve ze žíly. Provádíme jej ambulantně. Po zákroku doporučujeme jeden den klidový režim. Paušální vystavení pracovní neschopnosti není indikováno.

V 1–2 % odběrů dochází k celkové kontaminaci vzorku mateřskou krví. Toto neovlivňuje růst a cytogenetické vyšetření fetálních fibroblastů. V některých případech je plodová voda zbarvena starou krví po dřívějším intraamniálním krvácení. Tento nález zvyšuje riziko abortu a je potřeba jej uvést v protokolu o odběru.

Při odběru plodové vody je většinou ověřována i hladina alfafetoproteinu k vyloučení rozštěpových vad.

Výhoda vyšetření:

Jedná se o nejčastěji prováděné invazivní vyšetření. Tato metoda je poměrně bezpečná, s minimem komplikací či nutností odběr opakovat.

Možné komplikace vyšetření:

Riziko se pohybuje mezi 0,25–0,35 %, dříve uváděné 1 % neodpovídá skutečnosti. Na pracovištích s dostatečnými zkušenostmi a frekvencí výkonů počet komplikací nelze odlišit od počtu těhotenských ztrát, ke kterým by došlo i bez provedené invazivní diagnostiky.

Americký National Institute of Child Health and Human Development³ provedl velkou prospektivní studii, ve které porovnával soubor 1 040 pacientek s amniocentézou, provedenou z genetické indikace, s kontrolním souborem 950 pacientek. U pacientek s invazivním vyšetřením byl počet těhotenských ztrát 3,5 %, v kontrolním souboru 3,2 %. Tento rozdíl nebyl statisticky významný.

Data ze starších studií uváděla počet komplikací cca 1 %. Tyto studie již nelze považovat za relevantní vzhledem k naprosto nesrovnatelné kvalitě ultrazvukových přístrojů, používání jednorázových jehel 21–22 G, oproti jehlám o průměru 20 G⁴ a zkušenostem s odběry.

Exsanguinace plodu – nejčastější komplikace, která je způsobena poraněním pupečníku nebo větší cévy při transplacentárním přístupu. Typicky nacházíme při ultrazvukové kontrole hydropický plod bez akce srdeční.

Prevence: snaha o punkci při okraji placenty, ne v místě inserce pupečníku na placentě, výkon pod kontrolou ultrazvuku s dobrým rozlišením.

Předčasný odtok plodové vody, drobné špinění

Prevence: snaha o punkci co nejbliže fundu, tj. co nejdále od vnitřní branky. Při včasném preventivním nasazení antibiotik a klidovém režimu dochází v naprosté většině případů k úpravě.

Intraamniální infekce

Při použití jednorázových jehel a dodržení zásad asepse je tato komplikace velmi vzácná.

Poranění plodu

Velmi vzácná komplikace, v naprosté většině případů bez následků.

Poranění střevních kliček matky – vzácná komplikace, je možná u pacientek s adhezemi v dutině břišní.

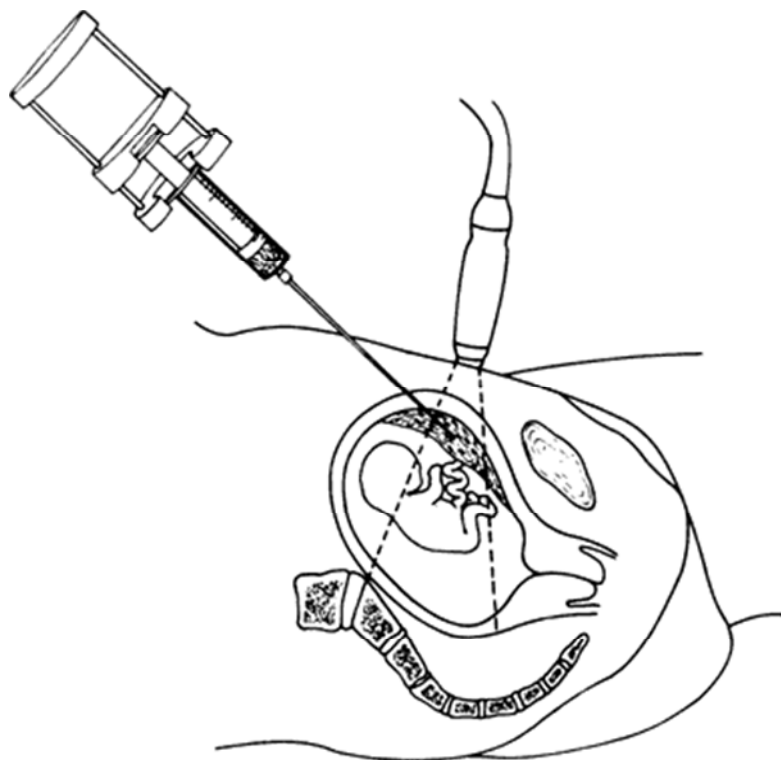
Časná amniocentéza

Jedná se o variantu amniocentézy, které je prováděna před 14. týdnem gravidity. Při odběru odebíráme takové množství plodové vody, které se rovná stáří plodu v týdnech. Při indikaci tohoto odběru je potřeba počítat s menším množstvím fibroblastů získaným z plodové vody – tj. s nutností delší kultivace v laboratoři a i nižší koncentrací DNA při qPCR vyšetření.

Časná amniocentéza je spojená s mírně vyšším rizikem komplikací oproti CVS. Je nutné počítat s vyšší frekvencí odtoku plodové vody, oproti klasické amniocentéze. Nicolaidides uvádí ve skupině pacientek s časnou amniocentézou 4,9 % celkových ztrát, oproti 2,1 % u CVS. Nejčastější indikací je technicky obtížně proveditelný CVS s vysoce suspektním ultrazvukovým nálezem u plodu.

Odběr choriových klků – CVS (chorionic villi sampling)

Vzhledem k výše uvedenému je do 14. týdne gravidity metodou volby při invazivní prenatalní diagnostice odběr choriových klků. Lze samozřejmě provést i kdykoli později.



Elias S, Simpson JL. Techniques and safety of genetic amniocentesis and chorionic villus sampling. In: Sabbagha RE [ed.]: Diagnostic Ultrasound applied to Obstetrics and Gynecology, p. 113. 3rd ed. Philadelphia, JB Lippincott, 1994.

Princip vyšetření:

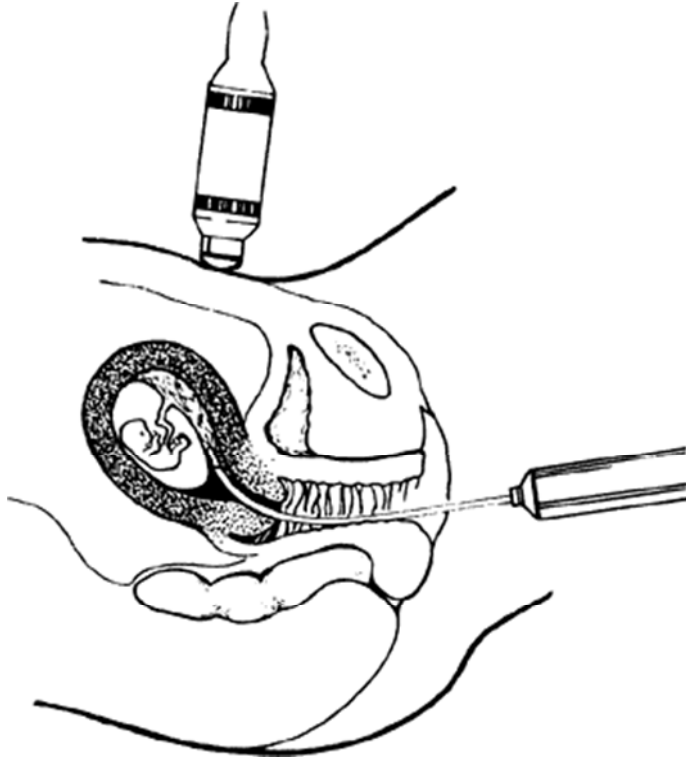
Vzhledem k tomu, že chromozomální složení placenty a plodu je stejné, lze vyšetřením choriových klků (trofoblastu) zjistit i počet chromozomů u plodu. Při výkonech prováděných před 10. týdnem těhotenství bylo prokázáno zvýšené procento transverzálních defektů končetin a anomálií obličeje. Provádění CVS před 11. týdnem proto není doporučeno.

Nevýhodou odběru je možná přítomnost placentární mozaiky⁸ (přítomnost dvou odlišných buněčných linií) v asi 1 % případů a nižší kvalita cytogenetických preparátů.

Provedení vyšetření:

Výkonu vždy předchází ultrazvukové vyšetření s výběrem vhodného místa vpichu. Před zákrokem je vhodná lokální anestezie zvoleného místa. Optimální je místo paralelní s inzercí placenty. Jehlu i odběrový set je nutné před odběrem propláchnout heparinem. Pod kontrolou ultrazvuku je přes břišní stěnu zavedena do placenty jehla (18–20 Gauge). Po vytažení mandrenu nasadíme na jehlu 20ml stříkačku, kterou je vyroben maximální podtlak, kterým odsajeme malý vzorek tkáně – choriových klků – cca 15–25 mg. Podtlak zachováváme do vytažení jehly z placenty. Během celého zákroku kontrolujeme hrot jehly ultrazvukem.

Variantou tohoto zákroku je transcervikální přístup pomocí speciálních odběrových setů. Výkon provádíme při děloze v retroverzi nebo placentě na zadní stěně, kdy nelze provést odběr transabdominálně. Odběrové sety obsahují kovový zavaděč, který se pod kontrolou ultrazvuku zavede do placenty a po jeho vytažení pomocí podtlaku získáváme cca 5–10 mg placentární tkáně. Zákrok není vhodné provádět při vaginální infekci nebo krvácení.



Elias S, Simpson JL. Techniques and safety of genetic amniocentesis and chorionic villus sampling. In: Sabbagha RE [ed.]: Diagnostic Ultrasound applied to Obstetrics and Gynecology, p. 113. 3rd ed. Philadelphia, JB Lippincott, 1994.

Výhody vyšetření:

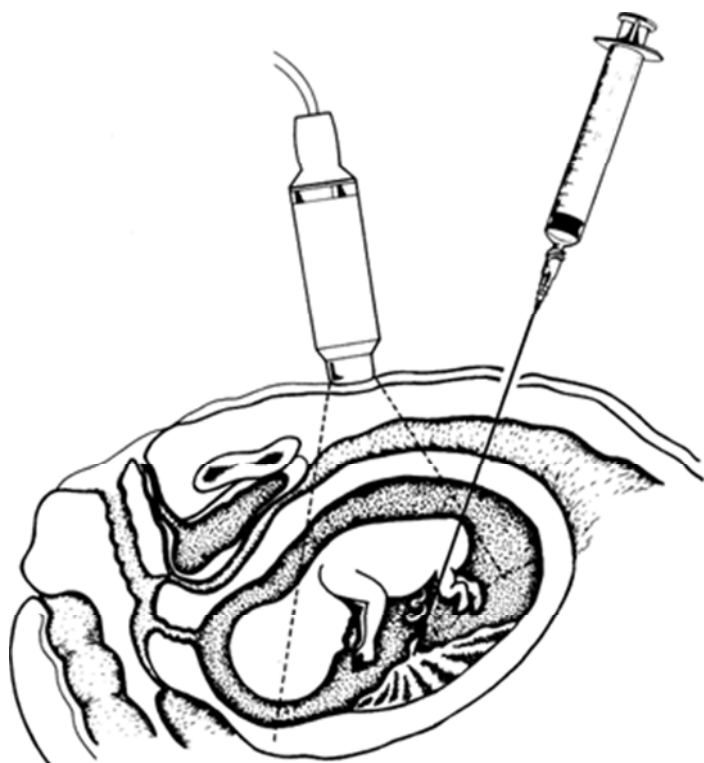
Toto vyšetření lze provést již od ukončeného 12. týdne těhotenství. Při vyšetření nepronikáme do amniální dutiny, tj. nehrozí odtok plodové vody. Riziko potratu po odběru je srovnatelné s odběrem plodové vody.

Transverzální léze končetin:

V roce 1991 publikoval Firth⁶ zprávu o zvýšeném riziku transverzálních lézí končetin, resp. s tzv. oromandibular-limb hypogenesis komplexem u (1,7 %, or 17 in 1,000) dětí po CVS. CVS bylo prováděno mezi 55.–66. dnem gestace, tj. 42.–50. den od koncepce. Některé další práce toto sice nepotvrdily, nicméně platí obecné doporučení neprovádět tento výkon před 11. týdnem gestace. Pokud provádíme CVS před 10. týdnem gestace (např. při hydropsu plodu), je vhodné toto zmínit také v informovaném souhlasu.

Kordocentéza – odběr fetální krve

Přibližně od 18. týdne je technicky možné pomocí punkce pupečníku odebrat i malý objem fetální krve. Tento zákrok je technicky obtížnější než jiné metody invazivní diagnostiky. Jeho výhodou je, že k vyšetření je možné přímo použít nekultivované fetální buňky, což zkracuje dobu potřebnou k vyhodnocení výsledku karyotypu na 2–3 dny.



Simpson JL, Elias S. Prenatal diagnosis of genetic disorders. In: Creasy RK, Resnik R [eds.]: Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice, p. 61. Philadelphia, WB Saunders, 1994.

Indikace zákroku:

Dříve byla nejčastější indikací časová tíseň, ev. objasnění mozaiky nalezené při odběru plodové vody nebo choriových klků.

Častou indikací je ověření hematokritu plodu při Rh isoimunizaci, ev. při plánování či provádění intrauterinní transfuze.

Při nález akutní virové, parazitární nebo bakteriální infekce u matky lze ověřit imunologickou odpověď plodu na infekci, tj. prokázat transplacentární přenos.

Fetální hemoglobin je možné využít při diagnóze srpkovité anemie, thalasemie nebo jiných hemoglobinopathiích, pokud není k dispozici DNA diagnostika. K dalším hematologickým indikacím patří diagnóza hemofilí, imunodeficitů, alloimunní trombocytopenie apod.

Další možnou indikací je plánování porodu při nálezu vývojové vady ve 3. trimestru.

Komplikace zákroku:

Tento výkon je spojen s vyšším rizikem komplikací, jako po CVS, ev. amniocentéze. Po provedené cordocentéze je riziko intrauterinního úmrtí, ev. abortu 3%.⁷

Biopsie kůže

Biopsie kůže se provádí v případech, kdy je třeba vyšetření buněk plodu z vody plodové doplnit genetickým vyšetřením jeho pojivových tkání.

Provedení zákroku:

V lokální anestezii pod ultrazvukovou kontrolou je speciálními biopsickými kleštěmi odebrán z gluteální oblasti plodu vzorek kůže.

Indikace:

Hereditární kožní onemocnění, které je nutné diagnostikovat imunohistologickým vyšetřením. Do spektra těchto chorob patří anhidrotická ektodermální dysplazie, ichtyózy, epidermolysis bullosa, Sjögren-Larssonův syndrom. Většinu těchto onemocnění lze již diagnostikovat pomocí vyšetření DNA při CVS.

Vyšetření získaného materiálu:

Cytogenetická analýza

Po 10–14denní kultivaci jsou buňky zastaveny v růstu ve fázi mitózy, fixovány a jednotlivé mitózy prohlíženy optickým mikroskopem. Ke spolehlivému vyhodnocení je nutné zkontrolovat cca 100 mitóz. K vyšetření jsou již používány počítačové programy, které dokážou připravit jednotlivé mitózy k analýze.

Amnio PCR (QFPCR)

Moderní metoda, která pomocí kvantitativní analýzy specifických markerů na jednotlivých chromozomech stanovuje jejich počet. Výhodou této metody je rychlost, výsledky jsou známy do 4 až 6 hodin od odběru.

Molekulárně genetická analýza

Používá se k cílené detekci a vyloučení mutací v jednotlivých genech, např. u cystické fibrózy.

Array-CGH (microarray)

Využívá moderní metodu (která tzv. odhalí malé změny v genetickém materiálu, tj. určí, zda něco chybí nebo přebývá, a to s 50× vyšším rozlišením než klasické metody cytogenetické analýzy. Kromě mikrodelečních syndromů lze vyloučit nejčastějších 143 specifických genetických syndromů.

FISH – fluorescent in situ hybridisation

Klasickou cytogenetickou analýzu je možné doplnit i dalšími metodami.

Jednou z nich je metoda FISH. Při této metodě fluorescenčně značená sonda hybridizuje se specifickým místem na chromozomu. Navázaná sonda je viditelná fluorescenčním mikroskopem. Metoda umožňuje lépe lokalizovat specifická místa chromozomů, např. při nebalancovaných translokacích. Dnes je používána jen výjimečně.

Literatura

1. CALDA, Pavel. Etické problémy prenatalní diagnostiky a terapie na počátku 3. tisíciletí. *Interní Med. pro praxi, Suppl.*, 2(2003), 6. Dostupné též z: <http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbcr/zc/918.pdf> (10.4.2009).
2. Invasive Prenatal Genetic Techniques
Shulman, L, Simpson, J, et al., *Glob. libr. women's med.*, (ISSN 1756-2228) 2008; DOI: 10.3843/GLOWM.1022.
3. National Institute of Child Health Development National Registry for Amniocentesis Study Group: Midtrimester amniocentesis for prenatal diagnosis: Safety and accuracy. *JAMA* 236:1471, 1976.
4. Tabor A, Philip J, Madsen MI et al. Randomized controlled trial of genetic amniocentesis in 4,606 low-risk women. *Lancet* 1: 1287, 1986.
5. Nicolaides K, Brizot ML, Patel F et al. Comparison of chorionic villus sampling and early amniocentesis for karyotyping in 1,492 singleton pregnancies. *Fetal Diagn Ther* 11: 9, 1996.
6. Firth HV, Boyd PA, Chamberlin P et al. Severe limb abnormalities after chorion villus sampling at 5566 days' gestation. *Lancet* 337: 762, 1991.
7. Daffos F. Fetal blood sampling. *Annu Rev Med* 40: 319, 1989.
8. Kypros H. Nicolaides. The 11–13⁺⁶ scan; Fetal Medicine Foundation, London, 2004.