



Doporučený postup genetického diagnostického prenatalního vyšetření (prenatální diagnostiku, PND).

Schváleno na schůzi výboru SLG ČLS JEP dne 11. 12. 2019 s platností od 1. 1. 2020

Základním předpokladem provedení PND je klinicko-genetické vyšetření obou partnerů provedené lékařem se specializovanou způsobilostí v oboru lékařské genetiky dle ustanovení zákona 373/2011 Sb. § 28-29 v aktuálním znění.

Nejčastější indikace PND:

- 1/ Prekoncepčně definované riziko genetické vady u plodu
- 2/ Pozitivní osobní a/nebo rodinná anamnéza dědičného onemocnění
- 3/ Výsledek prenatalního screeningového vyšetření (multimarkerové systémy, NIPT kontingenční test, ultrazvukový nálezh)
- 4/ Teratogenní riziko (např. intrauterinní infekce Cytomegalovirem, Toxoplasmou)
- 5/ Ad libitum (např. věk matky, anxiosita)

PND musí být prováděna laboratoři a metodami akreditovanými dle ČSN EN ISO 15189 dle ustanovení § 28–29 zákona 373/2011 Sb. v platném znění. Používané metody musí být akreditovány.

Individuální způsob PND každého páru vyplývá z nedirektivních závěrů klinicko-genetického vyšetření a rozhodnutí partnerů.

Doporučení Společnosti lékařské genetiky a genomiky ČLS JEP (www.slg.cz) odráží konsenzus evropských i zámořských odborných společností.

Materiál vyšetřovaný při PND:

Hlavním zdrojem materiálu jsou buňky získané choriovou biopsií (CVS) mezi 10.–13. gestačním týdnem nebo aminocentézou (AMC) / kordocentézou (PUBS) v pozdějších stádiích těhotenství. PND lze provádět i ze směsi fetálních a mateřských fragmentů DNA v mateřské plasmě (cfNIPT), z jednotlivých buněk plodu (jaderných erytrocytů nebo buněk trofoblastu) kolujících v oběhu matky (cbNIPT) nebo z buněk trofoblastu pronikajících do cervikálního kanálu (Trophoblast Retrieval and Isolation from the Cervix - TRIC). Důležitým materiálem pro PND jsou také tkáně konceptu z abortu.

Metody PND:

A: 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/ Metodou první volby při definovaném riziku častých aneuploidií je stanovení počtu chromosomů č. 13, 18, 21, X a Y rychlou kvantitativní fluorescenční polymerázovou reakcí (QF-PCR) zaměřenou na chromosom specifické délkové polymorfismy (Short Tandem Repeats – STR). Toto vyšetření je indikováno hlavně při pozitivním výsledku multimarkerového screeningu nebo při ultrazvukovém nálezu suspektním na časté aneuploidie (např. vyšší nuchální translucence plodu).

Výsledek vyšetření je k dispozici řádově do 1-2 pracovních dnů, což je důležité především v případě CVS vzhledem k možnosti včasného ukončení gravidity při průkazu patologie.

Porovnáním DNA profilů matky a plodu v oblasti STR markerů je v odebraném materiálu testována přítomnost ev. mateřské tkáně (maternální kontaminace). Metodou QF-PCR mohou být vyšetřeny i jiné aneuploidie (například časté aneuploidie produktů koncepce z abortů), polyploidie nebo významné mozaiky.

2/ Další metodou, která může být indikována buď primárně (například u mnohočetných vad plodu) nebo následně po vyloučení častých aneuploidií pomocí QF-PCR, je celogenomová chromosomální microarray (Chromosomal Microarray Analysis, CMA). CMA vyšetřuje submikroskopické změny počtu kopií chromosomů – mikrolece / mikroduplikace (Copy Number Variation, CNV) s citlivostí 50-100 Kb. CMA pokryje spektrum všech mikroskopických chromosomových nebalancovaných aberací vyšetřovaných standardní karyotypizací a je 100-1000× citlivější. CMA na rozdíl od karyotypu nezjistí balancované chromosomální přestavby a nízkofrekvenční chromosomální mozaiky.

Existují dvě techniky CMA: komparativní genomová hybridizace kontrolní a vyšetřované DNA (array CGH) a kvantitativní genotypizace jednonukleotidových polymorfismů (SNP array). Array CGH na rozdíl od SNP array nedetekuje některé typy polyploidie, ale ty je možno prokázat již předtím provedenou QF-PCR metodou. SNP array detekuje i neutrální změny počtu kopií (uniparnetální disomii, absenci heterozygosity).

Pro interpretaci CMA nálezů se využívají veřejně dostupné klinické databáze a jejich prohlížeče (OMIM, Ensembl, DECIPHER, UCSC). Nálezy jsou uchovávány v databázi laboratoře s možností reanotace. U prenatalních nálezů CMA se doporučuje snížit citlivost metody a reportovat genomické imbalance rozsáhlejší než 0,5 Mb. Dalším kritériem je genomová lokalizace nálezu: významné jsou CNV, které zasahují kódující oblasti genomu nebo jsou asociovány s publikovanými syndromy.

Riziko CNV nezávisí na věku těhotné. Frekvence klinicky významných CNV u plodů bez prokázané morfologické vady a s normálním karyotypem je 1–1,7 %. Pravděpodobnost nálezu klinicky významné CNV se zvyšuje při nálezu morfologické vady plodu – CNV jsou

prokazovány navíc u 5–10 % vyšetřovaných plodů s mnohočetnými vadami a normálním karyotypem. Z těchto důvodů je vyšetření metoda CMA indikována optimálně u všech PND po vyloučení nejčastějších aneuploidií metodou QF-PCR, v některých případech může být CMA nebo celogenomová NGS dokonce metodou první volby bez provedení QF-PCR (např. při opakovaném výskytu mnohočetných vad plodu). Pokud není u plodu prokázána morfologická vada a současně dostupná laboratoř zatím nedisponuje možností provádět vyšetření CMA, lze po provedení QF-PCR pokračovat klasickým vyšetřením karyotypu plodu.

Nález potenciálně klinicky významné CNV u plodu by mělo být verifikován vyšetřením rodičů stejnou technikou, případně dalšími metodami dle rozvahy (karyotyp, FISH, Sangerova sekvenace, NGS).

3/ V určitých indikacích (například při familiární translokaci nebo pro verifikaci nálezu jinou metodikou) je indikováno klasické vyšetření karyotypu plodu, i po již provedené analýze CMA.

4/ Sekvenování nové generace (NGS) – prenatalní vyšetření exomu (WES): Toto vyšetření může být indikováno ve specifických indikacích při negativní CMA (například při opakovaném výskytu vad plodu, vyšší nuchální translucence nebo suspektním fenotypu plodu). Vzhledem k technické a časové náročnosti jsou výsledky prenatalního WES používány převážně pro zpřesnění prognózy následující gravidity. Prenatální WES je zaměřeno na mutace v protein kódujících oblastech genomu, které sice představují jen asi 1–2 % celkové genetické informace (genomu), ale jsou příčinou až 85 % chorob s genetickou etiologií. Při dostatečné hloubce sekvenace je možné při WES detekovat kromě SNP a malých insercí a delecí i varianty počtu kopií (CNV) s vyšší citlivostí než většina technik CMA (~ 40 Kb). Teoreticky je možné pomocí WES detekovat CNV na úrovni exonu (~ 200 bp) a též chromosomální aneuploidie a jejich mozaiky.

B: Cílená vyšetření:

Výběr konkrétních vyšetřovacích metod u cílených prenatalních genetických vyšetření dle indikačních skupin 1 až 4 určuje indikující klinický genetik v závislosti na typu dědičnosti a specifickém riziku a provádějící akreditované laboratoři.

Reference:

1/ Prenatal Diagnostic Testing for Genetic Disorders.: Practice Bulletin No. 162 Summary. Obstetrics & Gynecology, 2016, 127(5), 976–978.

2/ Committee on Genetics and the Society for Maternal-Fetal Medicine.: Committee Opinion No.682: Microarrays and Next-Generation Sequencing Technology: The Use of Advanced Genetic Diagnostic Tools in Obstetrics and Gynecology. Obstet Gynecol. 2016 Dec;128(6):e262-e268.

3/ Armour CM, Dougan SD, Brock JA et al.: Practice guideline: joint CCMG-SOGC recommendations for the use of chromosomal microarray analysis for prenatal diagnosis and assessment of fetal loss in Canada. *J Med Genet.* 2018 Apr;55(4):215-221.

4/ https://www.bsgm.org.uk/media/956141/g144_useofcmapregnancy_jun15.pdf

5/ [https://www.ranzcog.edu.au/RANZCOG_SITE/media/RANZCOG-MEDIA/Women%27s%20Health/Statement%20and%20guidelines/Clinical-Obstetrics/Prenatal-screening-\(C-Obs59\)-July18.pdf?ext=.pdf](https://www.ranzcog.edu.au/RANZCOG_SITE/media/RANZCOG-MEDIA/Women%27s%20Health/Statement%20and%20guidelines/Clinical-Obstetrics/Prenatal-screening-(C-Obs59)-July18.pdf?ext=.pdf)

6/ Fiorentino F, Baldi M. Re: Microarray application in prenatal diagnosis: a position statement from the cytogenetics working group of the Italian Society of Human Genetics (SIGU), November 2011. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012 May;39(5):601-2

7/ Muys J, Blaumeiser B, Jacquemyn Y et al:
The Belgian MicroArray Prenatal (BEMAPRE) database:
A systematic nationwide repository of fetal genomic aberrations. *Prenat Diagn.* ,2018 Dec;38(13):1120-1128

8/ Mann K, Hills A, Donaghue C, Thomas H, Ogilvie CM. Quantitative fluorescence PCR analysis of >40,000 prenatal samples for the rapid diagnosis of trisomies 13, 18 and 21 and monosomy X. *Prenat Diagn.* 2012 Dec;32(12):1197-204

9/ Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC et al.: Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012 Dec 6;367(23):2175-84.

10/ Pauta M, Grande M, Rodriguez-Revenga L ety al.:Added value of chromosomal microarray analysis over karyotyping in early pregnancy loss: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.*, 2018 Apr;51(4):453-462.

11/ Breman, A.M. et al. Evidence for feasibility of fetal trophoblastic cell-based noninvasive prenatal testing. *Prenat. Diagn.*, 2016, 36, 1009–1019

12/ Huang, C.-E. et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidy by circulating fetal nucleated red blood cells and extravillous trophoblasts using silicon-based nanostructured microfluidics. *Mol. Cytogenet.* ,2017, 10, 44

13/ Moser G, Drewlo S, Huppertz B, Armant DR. Trophoblast retrieval and isolation from the cervix: origins of cervical trophoblasts and their potential value for risk assessment of ongoing pregnancies. *Hum Reprod Update.* 2018 Jul 1;24(4):484-496.

14/ Chandler N, Best S, Hayward J.: Rapid prenatal diagnosis using targeted exome sequencing: a cohort study to assess feasibility and potential impact on prenatal counseling and pregnancy management. *Genet Med.* 2018 Nov;20(11):1430-1437

15/ Marchuk DS, Crooks K, Strande N et al.: Increasing the diagnostic yield of exome sequencing by copy number variant analysis. *PLoS One.* 2018 Dec 17;13