

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Iva Vintrová

Vývoj a současný stav prenatální diagnostiky nejčastějších aneuploidií

Prenatal diagnosis of the most frequent aneuploidies: development and current situation

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Martina Langová, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 21. 8. 2013

Podpis:

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucí své bakalářské práce MUDr. Martině Langové, Ph.D. za věnovaný čas, odborné rady a vstřícnost.

Abstrakt

Prenatální diagnostika se z velké části zabývá odhalováním aneuploidií, protože jsou nejčastější příčinou mentálního a fyzického postižení v dětském věku a perinatálního úmrtí. Fetální buňky jsou v současnosti získávány téměř výhradně invazivními metodami prenatální diagnostiky, které s sebou nesou určité riziko spontánního potratu. K eliminaci tohoto rizika jsou screeningem nejprve vybrána těhotenství s vysokým rizikem výskytu aneuploidie a následně jsou fetální buňky analyzovány cytogenetickými a molekulárně-genetickými metodami.

Klíčová slova:

prenatální diagnostika, aneuploidie, biochemický screening, ultrazvukový screening, FISH, QF-PCR

Abstract

Prenatal diagnosis mainly focuses on revealing aneuploidies – the most frequent cause of mental and physical retardation in the childhood and perinatal death. Nowadays, fetal cells are obtained by invasive methods of prenatal diagnosis with some risk of spontaneous miscarriage. To eliminate those perils only pregnancies detected by screening as presenting high risk of aneuploidies are subjected to the cytogenetic and molecular-genetic methods.

Key words:

prenatal diagnosis, aneuploidies, biochemical screening, ultrasound screening, FISH, QF-PCR,

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Metody prenatalní diagnostiky.....	2
2.1. Screeningové metody – neinvazivní	2
2.1.1. Vývoj screeningových metod.....	2
2.1.2. Biochemický screening	3
2.1.2.1. Biochemický screening v I. trimestru	4
2.1.2.2. Biochemický screening ve II. trimestru	5
2.1.3. Ultrazvukový screening.....	6
2.1.3.1. Ultrazvukový screening v I. trimestru.....	6
2.1.3.2. Ultrazvukový screening ve II. trimestru.....	10
2.1.4. Možnosti screeningových programů	11
2.1.4.1. Kombinovaný test	11
2.1.4.2. Integrovaný test	12
2.1.4.3. Sérum integrovaný test.....	12
2.1.4.4. Kontingenční test.....	12
2.1.4.5. Sekvenční test.....	14
2.1.4.6. Biochemické testy ve II. trimestru	15
2.2. Cílené metody – invazivní.....	15
2.2.1. Odběr choriových klků.....	16
2.2.2. Amniocentéza.....	16
2.2.3. Kordocentéza.....	17
3. Metodika vyhodnocování vzorků získaných invazivní prenatalní diagnostikou	18
3.1. Klasická cytogenetická metoda	18
3.2. QF-PCR.....	18
3.3. FISH	21
4. Závěr.....	23
5. Seznam zkratk a slovníček pojmů	24
6. Seznam použité literatury.....	26

1. Úvod

Aneuploidie jsou hlavní příčinou fyzického postižení a mentální retardace v dětském věku, a proto se prenatální diagnostika z velké části snaží o snížení jejich incidence při narození. Nejčastějšími aneuploidii jsou trisomie chromozomu 21 (Downův syndrom) s incidencí při narození 1:800, trisomie chromozomu 18 (Edwardsův syndrom) s incidencí při narození 1:6500 a trisomie chromozomu 13 (Patauův syndrom) s incidencí při narození 1:12500. Tyto trisomie jsou kromě mentální retardace doprovázeny různými malformacemi charakteristickými pro daný syndrom a jejich výskyt s věkem těhotné stoupá. (Spencer, 2007) Dalšími častými aneuploidii jsou aneuploidie gonozomů jako je monosomie gonozomu X (Turnerův syndrom), která umožňuje přežít pouze plodům ženského pohlaví, Klinefelterův syndrom vyznačující se nadbytkem gonozomu X u plodů mužského pohlaví a další aneuploidie s nadbytečným gonozomem X, Y nebo oběma z nich. Aneuploidie gonozomů se vyskytují méně často než aneuploidie autozomů a jejich klinický projev není oproti aneuploidii autozomů tak závažný. U aneuploidii gonozomů není prokázán jejich nárůst s věkem těhotné. (Spencer, 2007)

Cílem práce je popsat a zhodnotit jednotlivé metody uplatňované v současné prenatální diagnostice nejčastějších aneuploidii a rovněž nastínit jejich vývoj.

2. Metody prenatální diagnostiky

2.1. Screeningové metody – neinvazivní

Screeningové metody umožňují pomocí neinvazivní metody vybrat podle určitých kritérií skupinu těhotných žen s vyšším rizikem výskytu chromozomálních aberací u plodu. Těmto těhotným s pozitivním výsledkem screeningu, tedy s individuálním rizikem překračujícím hraniční hodnotu rizika příslušného testu, je poté dle týdnu těhotenství nabídnuta jedna z invazivních metod prenatální diagnostiky. (Nicolaidis, 2003)

2.1.1. Vývoj screeningových metod

První pokusy o vytvoření screeningových programů byly zaznamenány na počátku 70. let minulého století. Tehdy byl jediným kritériem k oddělení těhotných žen s vyšším rizikem jejich věk, protože v této době již bylo povědomí o tom, že se zvyšujícím se věkem rodiček dochází k nárůstu výskytu Downova syndromu. Amniocentéza představovala pro budoucí matky určité riziko potratu, a proto spolu s finančním hlediskem nebylo žádoucí provádět odběr plodové vody plošně všem těhotným. (Nicolaidis, 2003)

Na začátku 80. let Merkatz *et al.* (1984) navrhli, aby se koncentrace α -fetoproteinu (AFP) ve II. trimestru stala spolu s věkem těhotné dalším kritériem při posuzování rizika výskytu aneuploidie. Na základě dřívějších objevů navrhli Wald *et al.* (1988) přidat k předchozím screeningovým kritériím ještě další dva biochemické markery, a to lidský choriový gonadotropin (hCG) a nekonjugovaný estriol (uE_3). Začleněním těchto tří biochemických markerů mezi screeningová kritéria zvýšilo zachytnost Downova syndromu dle Wald *et al.* (1992) na 48 % a dle Haddow *et al.* (1992) na 58 %, kteří publikovali své výsledky nedlouho po zavedení tohoto druhu screeningu.

Zkvalitnění ultrazvuku v 80. letech umožnilo detailní vyšetření vzhledu plodu a sonografisté byli schopni odhalit strukturální abnormality, které měly mj. souvislost s určitými druhy aneuploidii. Kombinací ultrazvukového a biochemického screeningu ve II. trimestru došlo k dalšímu zlepšení zachytnosti plodů s numerickými chromozomálními aberacemi. (Benacerraf *et al.*, 1987)

V 90. letech byly publikovány významné objevy, které umožnily posun screeningu do I. trimestru těhotenství. Na začátku 90. let bylo popsáno, že u stanovování hladiny hCG ve II. trimestru je efektivnější zjišťovat koncentraci volné β -podjednotky ($f\beta$ -hCG) než celé molekuly (ThCG), protože pomocí tohoto kritéria lze zachytit více plodů s trisomií 21

(Macri *et al.*, 1990). Dva roky poté Van Lith *et al.* (1992) předložili své výsledky, v nichž ukázali, že ve všech pozorovaných těhotenstvích s Downovým syndromem byla významně zvýšená hladina inhibinu ve II. trimestru v průměru téměř dvakrát. Následující rok byla popsána souvislost mezi nízkou koncentrací Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) v I. trimestru (Brambati *et al.*, 1993) a abnormálním karyotypem. Jelikož se koncentrace volné β -podjednotky hCG u plodů s normálním karyotypem dostatečně odlišuje od této koncentrace u plodů s Downovým syndromem již v I. trimestru (Spencer *et al.*, 2002), byl navržen další screeningový program, který určuje rizikovou skupinu těhotných podle měření koncentrace volné β -podjednotky hCG a PAPP-A v I. trimestru, a inhibin byl doplněn jako čtvrtý biochemický marker stanovovaný ve II. trimestru.

V roce 1992 objevili Nicolaides *et al.* (1992a) souvislost mezi zvýšenou nuchální translucencí (NT) (detailněji popsána v kapitole 2.1.3.1.) měřenou v I. trimestru a chromozomálními abnormalitami. Tento objev znamenal rozšíření využití ultrazvukové diagnostiky od posouzení vzhledu plodu k měření určitých vzdáleností sloužících jako markery a doplnil v prvotrimestrálních screeningových kritériích biochemické markery. Na základě zmíněného objevu byla provedena rozsáhlá studie zahrnující více než 100 000 těhotných. Byla hodnocena záchytnost Downova syndromu na základě NT a věku těhotné a jejím výsledkem byla záchytnost Downova syndromu 82,2 % (Snijders *et al.*, 1998).

Výše zmíněné markery daly vzniknout několika druhům screeningových programů, které různě kombinují některá nebo všechna zmíněná kritéria. V I. trimestru se sleduje šířka NT, koncentrace $f\beta$ -hCG a PAPP-A. Ve II. trimestru se sleduje koncentrace AFP, uE_3 , hCG (volné β -podjednotky či celé molekuly) a inhibinu a věk matky se zohledňuje v obou trimestrech. Podle kritérií daného screeningového programu (dále popsány v kapitole 2.1.3.) je těhotné stanoveno individuálního riziko výskytu postiženého plodu. Pro stanovení individuálního rizika těhotné byly vyvinuty počítačové programy, které urychlily jeho výpočet.

2.1.2. Biochemický screening

V rámci biochemického screeningu se zjišťují koncentrace látek fetoplacentárního původu v mateřském séru, které slouží jako biochemické markery možného výskytu aneuploidii. Koncentrace těchto látek v mateřském séru v závislosti na týdnu gestace kolísají (Spencer *et al.*, 2002). Z toho důvodu jsou zvoleny odlišné biochemické markery k testování v I. a ve II. trimestru. V prvním trimestru se stanovuje hladina PAPP-A a $f\beta$ -hCG (Wald *et al.*, 2003a). Ve druhém trimestru se u double testu určuje koncentrace AFP a hCG (celé molekuly či volné β -podjednotky), u triple testu navíc koncentrace uE_3 a u quadruple

testu navíc ještě koncentrace inhibinu A (Wald *et al.*, 2003a). K možnosti srovnání jsou výsledky koncentrace převáděny na násobek mediánu (MoM) nezasažených těhotenství v příslušném stupni gestace. Hodnota mediánu u normálních plodů je 1 MoM. Laboratoře si tomu příslušnou hodnotu koncentrace stanovují samy na základě vlastních výsledků nezasažených těhotenství tak, aby byla aktuální. Nezbytným předpokladem tohoto screeningu je proto přesné určení délky těhotenství v době testování. Stáří plodu se určuje pomocí ultrazvuku měřením temeno-kostrční délky nebo biparietálního průměru (BPD – vzdálenost temených kostí). (Spencer *et al.*, 2002)

2.1.2.1. Biochemický screening v I. trimestru

U plodů s Downovým syndromem je koncentrace PAPP-A mezi 8. a 14. týdnem oproti euploidním plodům snížena, přičemž pokles je výraznější mezi 8. a 11. týdnem než mezi 12. a 14. týdnem těhotenství (Wald *et al.*, 1996). Ukazuje to na snižující se rozdíl v koncentraci PAPP-A se stupněm těhotenství mezi plody s trisomií 21 a euploidními plody. Ve II. trimestru se plody s trisomií 21 od těch euploidních liší v koncentraci tohoto markeru minimálně, což demonstrují Berry *et al.* (1997). Koncentrace PAPP-A v této studii dosahovala u postižených plodů ve II. trimestru 0,94 MoM a v I. trimestru 0,50 MoM.

Plody s trisomií 21 vykazují mezi 8. a 14. týdnem nárůst v koncentraci volné β -podjednotky hCG oproti euploidním plodům. U Spencer *et al.* (2002) narůstala koncentrace tohoto markeru u zasažených plodů z 1,31 MoM v 8. týdnu na 1,90 MoM v 11. týdnu a na 2,24 MoM v 15. týdnu. Následně začala mírně klesat.

Protože mají oba markery se vzrůstajícím stupněm těhotenství opačnou tendenci v rozdílu koncentrací zasažených a nezasažených těhotenství, bylo nutné najít optimální rozmezí gestačního stáří pro stanovení hladiny zmíněných markerů v I. trimestru. Spencer *et al.* (2003) ve své studii uvádějí, že nejvyšší záchytnosti (DR) je dosaženo při kombinaci obou výše zmíněných markerů během 8. týdne, a to 72,5 % při falešné pozitivitě (FPR) 4,29 %. S pokročilým stupněm gestace DR klesá na 62,6 % za zvýšení FPR na 5,27 % ve 13. týdnu. Např. pro laboratoře v České republice bylo vydáno doporučení provádět biochemický screening v gestačním stáří 9.⁺¹ – 13.⁺⁶ a jako optimum bylo uvedeno stáří v období mezi 9.⁺¹ a 11.⁺³ (<http://ukb.lf1.cuni.cz/~dbezdz/Doporuceni.htm>).

Kromě trisomie 21 lze pomocí těchto biochemických markerů odhalit také další aneuploidie. U trisomie 13 je mezi 10. a 14. gestačním týdnem koncentrace PAPP-A snížena na 0,248 MoM a β -hCG na 0,506 MoM (Spencer *et al.*, 2000a). U trisomie 18 je ve stejném období koncentrace obou markerů také nižší, vykazuje hodnotu 0,177 MoM u PAPP-A

a 0,281 MoM u β -hCG (Tul *et al.*, 1999). U Turnerova syndromu je mezi 10. a 14. týdnem koncentrace PAPP-A snižená na 0,49 MoM, ale u β -hCG se od koncentrace euploidních plodů výrazně neliší, protože dosahuje 1,11 MoM (Spencer *et al.*, 2000b). U syndromů 47,XXX, 47,XXY a 47,XYY byla ve stejném období jako ve výše zmíněných případech hladina β -hCG výrazně zvýšená na 2,07 MoM, avšak koncentrace PAPP-A se u těchto tří syndromů výrazně neodlišovala (0,88 MoM) (Spencer *et al.*, 2000b). V tomto období vykazovaly výraznou změnu i plody s triploidií. Dosahovaly významně zvýšené hladiny β -hCG (4,59 MoM), ThCG (3,13 MoM) i AFP (2,14 MoM) a naopak výrazně snížené hladiny PAPP-A s hodnotou 0,12 MoM (Spencer *et al.*, 2000c).

Protein ADAM 12 měl ambici stát se dalším biochemickým markerem v I. trimestru. První výsledky ukazovaly, že jeho koncentrace mezi 8. a 13. týdnem je u plodů s Downovým syndromem výrazně snižená (0,17 MoM) (Laigaard *et al.*, 2003). Jiná studie tvrdila, že jeho koncentrace je sice u takto postižených plodů v 10. – 11. týdnu výrazně snižená (0,50 MoM), ale rozdíl oproti normálním plodům klesá, a ve 13. týdnu je hladina naopak zvýšená (1,38 MoM) (Laigaard *et al.*, 2006). Další dvě studie zaznamenaly pokles hladiny tohoto proteinu v I. trimestru (0,68 MoM, resp. 0,961 MoM), který však nebyl významný (Christiansen *et al.*, 2010; Poon *et al.*, 2009). Výsledky publikovaných studií naznačují, že ADAM 12 se zřejmě nezařadí mezi dva prvotrimestrální biochemické markery.

2.1.2.2. Biochemický screening ve II. trimestru

Ve druhém trimestru lze biochemický screening realizovat formou tří druhů testů. Podle počtu stanovovaných markerů jsou to double test, triple test a quadruple test. Účinně lze na základě druhotrimestrálního biochemického screeningu predikovat pouze výskyt plodu s trisomií 21 a 18 případně ještě s triploidií (Spencer, 2007). U ostatních aneuploidií není rozdíl v koncentraci markerů statisticky významný.

Ve výsledcích rozsáhlé studie SURUSS (Serum Urine and Ultrasound Screening Study) (Wald *et al.*, 2003a) vykazovaly plody s trisomií 21 v období mezi 14. a 20. gestačním týdnem sníženou hladinu AFP na 0,74 MoM. Koncentrace uE_3 byla rovněž snižená na 0,70 MoM. Hladina hCG byla u těchto plodů naopak zvýšená, a to na 2,05 MoM u celkového hCG a na 2,66 MoM u volné β -podjednotky hCG.

U plodů s Edwardsovým syndromem jsou ve druhém trimestru snížené hladiny AFP, uE_3 a hCG. Hladina inhibinu A je u těchto plodů normální. AFP byla u Palomaki *et al.* (1995) snížena na 0,65 MoM, uE_3 na 0,43 MoM a hCG na 0,36 MoM.

Z výše zmíněných údajů vyplývá, že lze čtyři biochemické markery účinně měřit mezi 14. a 20. týdnem. Např. pro laboratoře analyzující mateřské sérum v České republice byl také na základě studie SURUSS zvolen doporučený termín pro screening Downova syndromu mezi 14. a 20. gestačním týdnem, přičemž optimem je období mezi 15. a 17. gestačním týdnem (<http://ukb.lf1.cuni.cz/~dbezdz/Doporuceni.htm>).

2.1.3. Ultrazvukový screening

2.1.3.1. Ultrazvukový screening v I. trimestru

Ultrazvukové vyšetření plodu v I. trimestru především zjišťuje přítomnost markerů, u nichž byla prokázána souvislost s výskytem chromozomálních aberací, protože plod ještě nevykazuje všechny abnormality charakteristické pro daný syndrom v takové míře jako ve druhém trimestru. V současnosti je hlavním ultrazvukovým markerem sloužícím ke screeningu aneuploidií šířka nuchální translucence. Kromě NT se posuzuje přítomnost resp. absence nosní kosti na ultrazvuku, určuje se FMF úhel, provádí se dopplerometrie ductus venosus a trikuspidální chlopně a zjišťuje se přítomnost vrozených vývojových vad, které mohou být mj. projevem aneuploidie. Toto ultrazvukové vyšetření se provádí v gestačním stáří 11⁺⁰. – 13.⁺⁶. (Sonek, 2007)

Temeno-kostrční délka

Temeno-kostrční délka (CRL) je nejpřesnější metoda k určení stáří plodu. V případě použití CRL jako markeru k prokázání růstové retardace v I. trimestru se výsledky jednotlivých studií značně liší. Shodují se ale na tom, že u chromosomálně abnormálních plodů je růstová retardace častější než u plodů bez chromozomálních abnormalit. V I. trimestru může dojít k růstové retardaci u plodů s trisomií 18, triploidních plodů a k mírnější růstové retardaci u plodů s trisomií 13 a Turnerovým syndromem. U plodů s trisomií 21 se však CRL významně neliší od euploidních plodů. (Sonek, 2007)

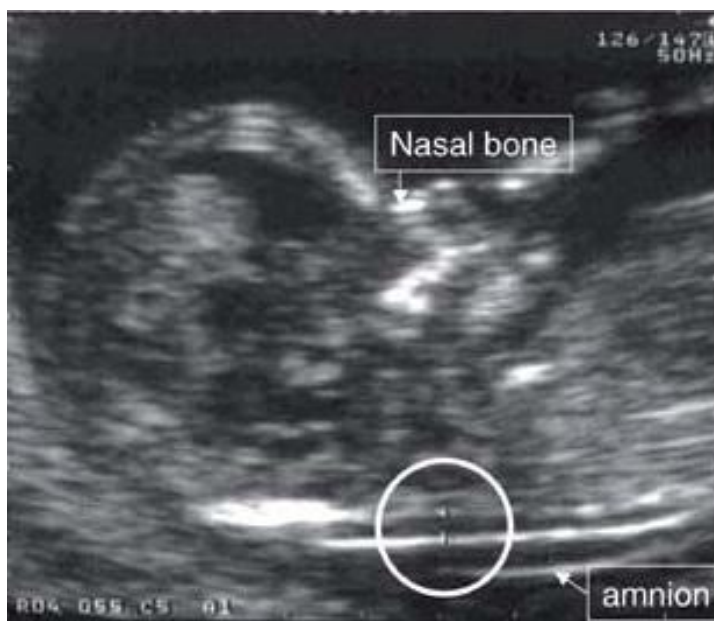
Nuchální translucence

Jako nuchální translucence nebo též šíjové projasnění se označuje nahromadění tekutiny v měkkých tkáních v zátylku plodu. Tento útvar je viditelný na ultrazvuku v prvním trimestru. Ve druhém trimestru dojde ve většině případů k jeho vsáknutí a v patologických případech se z něj vyvine nuchální edém či cystický hygrom. (Nicolaidis *et al.*, 1992a)

NT se měří ve výše zmíněném gestačním stáří, přičemž nejlepší výsledky poskytuje měření mezi 12. a 13. týdnem (Wright *et al.*, 2008). V době měření NT by se měla CRL pohybovat

v rozmezí 45 – 84 mm (Wright *et al.*, 2008). Zvýšená hodnota NT je indikátorem zvýšeného rizika trisomie chromosomu 21, 18, 13, Turnerova syndromu a dalších chromozomálních abnormalit (Snijders *et al.*, 1998). Dle (Wright *et al.*, 2008) je medián NT u trisomií chromosomů 21, 18, 13 a Turnerova syndromu 3,4; 5,5; 4,0 resp. 7,8 mm, přičemž medián nezasažených plodů činil 2,0 mm.

Horní časová hranice pro měření NT byla zvolena z následujících důvodů. Těhotné ženy mají možnost ukončit těhotenství dříve s nižším rizikem komplikací. Úspěšnost změření NT mezi 10. a 13. týdnem se pohybuje od 98 do 100 %, zatímco od 14. týdne se tato úspěšnost snižuje na 90 % (Whitlow *et Economides*, 1998). Dolní časová hranice pro měření NT byla stanovena z těchto důvodů. K potvrzení rizika určeného screeningem je zároveň nutný diagnostický test, který by případnou anomálii potvrdil. U nejčasnější metody invazivní prenatalní diagnostiky, odběru choriových klků, byla prokázána redukce končetin, byl-li odběr proveden před 10. týdnem těhotenství (Firth *et al.*, 1994). Zároveň bylo zjištěno, že mnoho hlavních strukturálních defektů lze diagnostikovat až od 11. týdne (Whitlow *et Economides*, 1998).



Obr. 1. Standardizované zobrazení pro měření NT plodu. Je také vidět nosní kost, ale vizualizace nosní kosti při standardizovaném měření NT není vyžadována. Převzato ze Sonek *et al.*, 2007)

Nosní kost

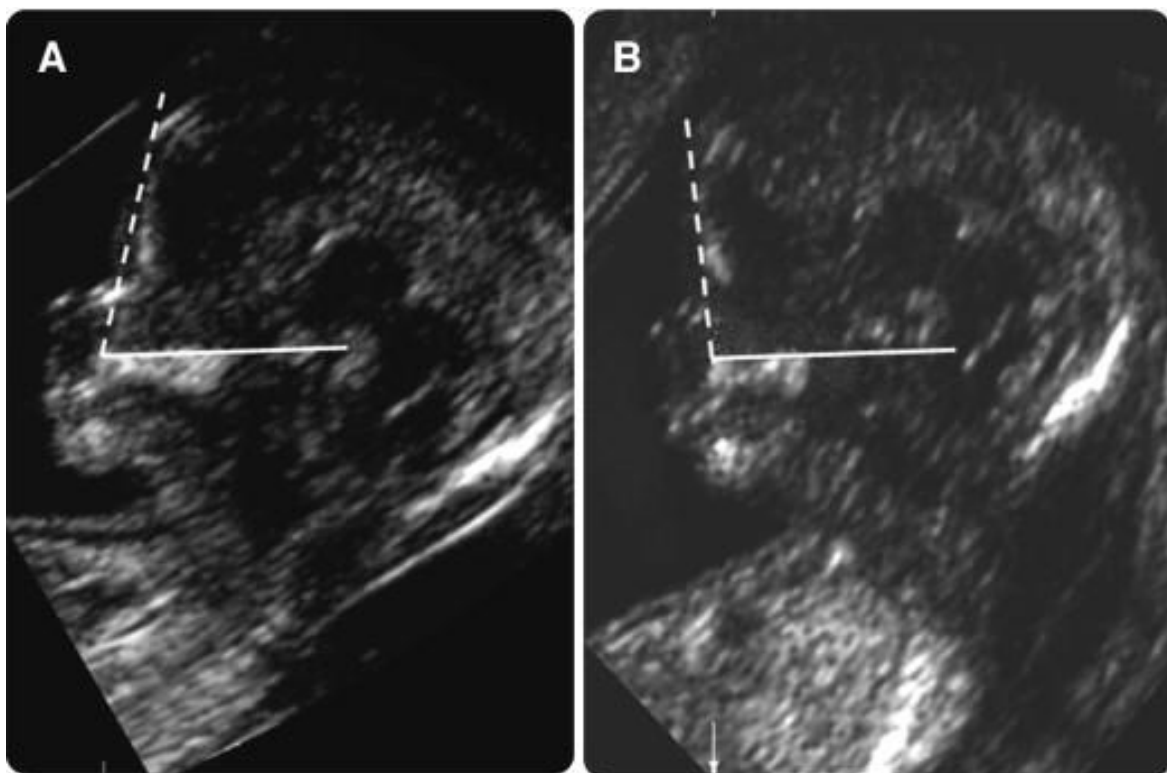
Studie (Cicero *et al.*, 2001) ukázala, že u 99,5 % chromosomálně normálních plodů je mezi 11. a 14. týdnem těhotenství sonograficky pozorovatelná nosní kost (NB). Tento výsledek je v souladu s historickými a radiologickými studiemi potracených plodů, které ukázaly, že se nosní kost objevuje nejdříve při temeno-kostrční délce 42 mm a s délkou gestace lineárně narůstá. U 73 % plodů s trisomií 21 nebyla nosní kost mezi 11. a 14. týdnem sonograficky

detekovatelná. Tento nález může být následkem hypoplázie nebo pozdější osifikace této kosti. (Cicero *et al.*, 2001)

Další studie (Cicero *et al.*, 2004a) uvádí, že v 95 % případů si lze úspěšně prohlédnout profil plodu. V přibližně 70 % případů nelze pozorovat nosní kost u plodů s trisomií 21, v 55 % případů u trisomie 18 a v 34 % případů u trisomie 13. Posouzení přítomnosti nosní kosti je tedy jedním z významných sonografických markerů ve screeningu aneuploidií. (Cicero *et al.*, 2004a)

Měření frontomaxilárního úhlu

Cicero *et al.* (2004b) přestavili studii pozorující zkrácenou délku i šířku maxilly u plodů s trisomií 21. Rozdíly oproti fyziologickým těhotenstvím však nebyly dostatečně významné pro možnost zavedení tohoto měření do klinické praxe. Studie ovšem přispěla k představení nové metody hodnocení plodu s trisomií 21 – měření frontomaxilárního obličejového (FMF) úhlu pomocí 3D ultrazvuku. FMF úhel je úhel mezi horním povrchem horního patra a čelní kostí (Sonek *et al.*, 2007). Studie, kterou provedli Sonek *et al.* (2007), ukazovala výrazný rozdíl mezi průměrnými hodnotami FMF úhlu pro plody s trisomií 21 ($88,7^\circ$) a euploidními plody ($78,1^\circ$). U 69 % plodů s trisomií 21 byl FMF úhel nad 95. percentilem normálního rozpětí (85°) a u 40 % trisomických plodů byl FMF úhel nad hranicí normálního rozpětí (90°).



Obr. 2. Profily plodů a obličejové úhly pořízené ultrazvukem. V části A je zobrazen euploidní plod a v části B plod s trisomií 21. (Převzato ze Sonek *et al.*, 2007)

Dopplerometrické měření průtoku krve v ductus venosus

Ductus venosus (DV) je žilní spojka přítomná během embryonálního vývoje. Ductem je okysličená krev přicházející umbilikální vénou odváděna do koronárního a cerebrálního oběhu. Děje se to přednostním prouděním přes foramen ovale do levé síně. Průtok krve v DV má charakteristický vlnový průběh s vysokou rychlostí během ventrikulární systoly (S-vlna) a diastoly (D-vlna). Během atriální kontrakce (a-vlna) dochází k výraznému poklesu rychlosti, ale přímý tok je zachován. V případě úplného zastavení přímého toku a při zpětném toku je a-vlna považována za abnormální. (Sonek, 2007)

Abnormální průtok touto spojkou je spojován s chromosomálními aberacemi (Maiz *et al.*, 2009) a srdečními defekty (Matias *et al.*, 1999). Data kombinovaná z několika studií udávají, že abnormální průtok DV byl zaznamenán u 5,2 % plodů bez chromozomální aberace, u 70,8 % plodů s trisomií 21, u 89,3 % plodu s trisomií 18, u 81,8 % plodů s trisomií 13 a u 76,9 % plodů s Turnerovým syndromem (Maiz *et al.*, 2009).

Dopplerometrické měření trikuspidální regurgitace

Dopplerometrické měření regurgitace, tedy zpětného toku trojcípou chlopní (TCV), se využívá k záchytu srdečních defektů plodu (Huggon *et al.*, 2002). Protože jsou chromozomální aberace často asociovány se srdečními defekty, byla provedena studie zjišťující souvislost abnormálního průtoku krve TCV s chromozomálními anomáliemi v gestačním stáří 11.⁺⁰ – 13.⁺⁶ (Huggon *et al.*, 2003). Tato studie prokázala u 83 % plodů se zpětným tokem krve v TCV abnormální karyotyp. Tyto výsledky podporuje také jiná studie (Faiola *et al.*, 2005), v níž 65,1 % plodů s trisomií 21 a 50 % plodů s trisomií 18 nebo 13 vykazovalo zpětný tok krve v TCV.

Ostatní strukturální rozdíly

Další ultrazvukové nálezy, které znamenají zvýšené riziko aneuploidii, jsou: jedna umbilikální arterie (SUA), megacystis, omfalokéla a holoprosencefalie.

Jedna umbilikální arterie dle (Rembouskos *et al.*, 2003) představuje 77,8% riziko vývinu plodu s trisomií 18, ale pouze 11,4% riziko vývinu plodu s trisomií 21. SUA tedy souvisí pouze s trisomií 18. Liao *et al.* (2003) ve své studii tvrdí, že riziko vzniku aneuploidii při výskytu megacystis s délkovým parametrem močového měchýře 7 – 15 mm je 23,6 %, a to hlavně u trisomie 18 a 13. Omfalokéla je spojována zejména s výskytem trisomie 18, a to přibližně u 60 % těchto plodů (Van Zalen-Sprock *et al.*, 1997). Riziko holoprosencefalie je spojováno zejména s výskytem trisomie 13, avšak činí pouze 24 % (Snijders *et al.*, 1999).

Byly publikovány studie mající ambici objevit další UZ markery sloužící k záchytu plodů s trisomií 21. Vykazovaly u trisomických plodů kratší délku uší (Sacchini *et al.*, 2003) nebo kratší femur a humerus (Longo *et al.*, 2004) v období prvotrimestrálního screeningu. Výsledky plodů s trisomií 21 se však neodlišovaly od výsledků euploidních plodů natolik významně, aby mohly popsané rozdíly sloužit jako markery pro ultrazvukový screening.

2.1.3.2. Ultrazvukový screening ve II. trimestru

Ultrazvukové vyšetření ve II. trimestru se provádí zpravidla mezi 18. a 22. gestačním týdnem. Přístup je oproti prvotrimestrálnímu screeningu rozdílný. V pozdějším stádiu těhotenství vykazuje již příslušná aneuploidie své syndromatické znaky. Ve druhém trimestru se tyto abnormální nálezy zjišťují, protože při prvotrimestrálním ultrazvukovém vyšetření nebyly viditelné, nebyly přítomny případně nebylo vyšetření v I. trimestru provedeno vůbec. (Nicolaidis, 2003)

Trisomie chromozomu 21

Tato aneuploidie známá jako Downův syndrom je ve své pozdější fázi intrauterinního vývoje spojována s brachycefálií, jemnou ventrikulomegalií, hypoplázií nosu, nuchálním edémem (nebo zvýšenou tloušťkou nuchálního záhybu), srdečními abnormalitami (hlavně defekty atrioventrikulárního septa), atrézií duodena, hyperechogenním střevem a mírnou hydronefrózou. Dále Downův syndrom vykazuje zkrácení femuru a výraznější zkrácení humeru, klinodaktylii nebo mírnou hypoplázií článku 5. prstu. (Nicolaidis *et al.*, 1992b; Nicolaidis, 2003)

Trisomie chromozomu 18

Tato trisomie doprovázená fenotypem Edwardsova syndromu je ve II. trimestru sonograficky detekovatelná pomocí charakteristického tvaru hlavy v podobě jahody, cysty choroideálního plexu, nepřítomnosti kalózního tělesa, zvětšené cisterny magny, rozštěpu obličeje, mikrognatie, nuchální edému, srdečních abnormalit, hernie bránice, atrézie jícnu, jedné umbilikální arterie, poruchy ledvin, echogenního střeva, myelomeningokély, růstové retardace se zkrácenými končetinami, aplázie radia, překrývajících se prstů na ruce i na nohou a kolébkovitých chodidel. (Nicolaidis *et al.*, 1992b; Nicolaidis, 2003)

Trisomie chromozomu 13

Na tuto chromozomální aberaci známou pod názvem Patauův syndrom můžou sonografistu upozornit abnormality obličeje, holoprosencefalie, mikrocefalie, abnormality srdce a ledvin,

často zvětšené a echogenní ledviny, omfalokéla a postaxiální polydaktylie. (Nicolaidēs *et al.*, 1992b; Nicolaidēs, 2003)

Turnerův syndrom

Tuto monosomii gonozomu X lze ultrazvukem zachytit, pokud plod ženského pohlaví vykazuje přítomnost velkého nuchálního cystického hygromu, celkový otok a ascites, srdeční vady (koarktace aorty) a podkovovité ledviny s oboustrannou mírnou hydronefrózu. (Nicolaidēs *et al.*, 1992b; Nicolaidēs, 2003)

Triploidie

Pokud je tato letální polyploidie odvozená od otce, je charakteristická molární přestavbou placenty a zpravidla do 20. týdne dochází ke spontánnímu abortu. V případě maternálně odvozené triploidie má placenta normální stavbu, ale je tenká a plod vykazuje asymetrickou růstovou retardaci. Maternálně odvozená triploidie se projevuje ventrikulomegalií, mikrognacií, srdečními defekty, myelomeningokélou a syndaktylií. Takovéto těhotenství může trvat až do 3. trimestru. (Nicolaidēs *et al.*, 1992b; Nicolaidēs, 2003)

2.1.4. Možnosti screeningových programů

Úspěšnost jednotlivých screeningových programů charakterizuje procento detekce (DR), tedy záchytnost, hladina falešné positivity (FPR) a hraniční hodnota rizika (cut-off level). DR určuje podíl skutečně postižených a těch, které test určil jako postižené. FPR určuje kolik procent zdravých plodů test označil za postižené. Hraniční hodnota rizika je zvolena a určuje, zda je výsledek screeningového programu pozitivní či negativní. Tyto parametry umožňují porovnat mezi sebou jednotlivé testy. (Cuckle, 2002)

2.1.4.1. Kombinovaný test

U tohoto testu se stanovuje riziko trisomie 21, 18 a 13 na základě věku těhotné, koncentrace PAPP-A a β -hCG a hodnoty NT v I. trimestru. Celý test je možné absolvovat během jedné návštěvy mezi 11. a 14. týdnem, nejlépe však ve 12. týdnu, a dosahuje DR 86 % při FPR 3 % nebo 90 % při FPR 5 % (Wright *et al.*, 2010). Bindra *et al.* (2002) prezentuje také 90% DR při 5% FPR pro provedení kombinovaného testu při jedné návštěvě. Kritérii pro zvolení optimálního gestačního stáří tohoto testu jsou nejen dva biochemické markery a NT, ale zároveň malformace plodu (Wright *et al.*, 2010). Zjišťování fetálních malformací je nejúčinnější mezi začátkem 12. a koncem 13. týdne (Souka *et al.*, 2004) (optimální gestační

stáří pro PAPP-A s β -hCG a NT je popsáno v kapitole 2.1.2.1. resp. 2.1.3.1.1.). Druhou možností jak realizovat tento test je při dvou oddělených návštěvách, a to nejlépe provedením náběrů krve mezi 9. a 10. týdnem a měřením NT ve 12. týdnu. V této formě testování dosahuje DR u Wright *et al.* (2010) 90 % při FPR 3 % a zároveň 93% DR při 5% a u Kagan *et al.* (2008) je DR 94 % při 3% FPR a zároveň při 5% FPR je DR 96 %. Třetí možnost provedení tohoto testu je měření NT ve 12. týdnu, zjišťování koncentrace PAPP-A v 9. týdnu a určování koncentrace volné β -hCG ve 12. týdnu a později. Tímto provedením testu lze dosáhnout DR 92 % při 3% FPR resp. 95% DR při FPR 5 % (Wright *et al.*, 2010).

2.1.4.2. Integrovaný test

Tento test stanovuje riziko trisomie 21, 18 a 13 na základě věku těhotné, šířky NT, koncentrace PAPP-A a β -hCG v I. trimestru a koncentrace AFP, hCG, uE₃ a inhibinu A ve II. trimestru. Výsledek testu je však uzavřen až ve II. trimestru po stanovení koncentrace druhotrimestrálních biochemických markerů. Dle studie SURUSS (Wald *et al.*, 2003a) dosahuje tento test záchytnosti 94 % při FPR 5% a dle Malone *et al.* (2005) je DR mezi 94 a 96 % při 5% FPR.

2.1.4.3. Sérum integrovaný test

Tento test stanovuje riziko trisomie 21, 18 a 13 na základě věku těhotné, koncentrace biochemických markerů v I. trimestru (PAPP-A a β -hCG) a všech biochemických markerů ve II. trimestru (AFP, hCG, uE₃, inhibin A). Podle studie SURUSS (Wald *et al.*, 2003a) je DR tohoto testu 87 % při 5% FPR. Dle rozsáhlé americké studie (Malone *et al.*, 2005) dosahuje tento test DR v rozmezí 85 až 88 % při 5% FPR. Kvůli nižší záchytnosti, než jakou vykazuje integrovaný test, se provádí pouze tam, kde není dostatečné vybavení nebo chybějí specialisté schopní NT změřit.

2.1.4.4. Kontingenční test

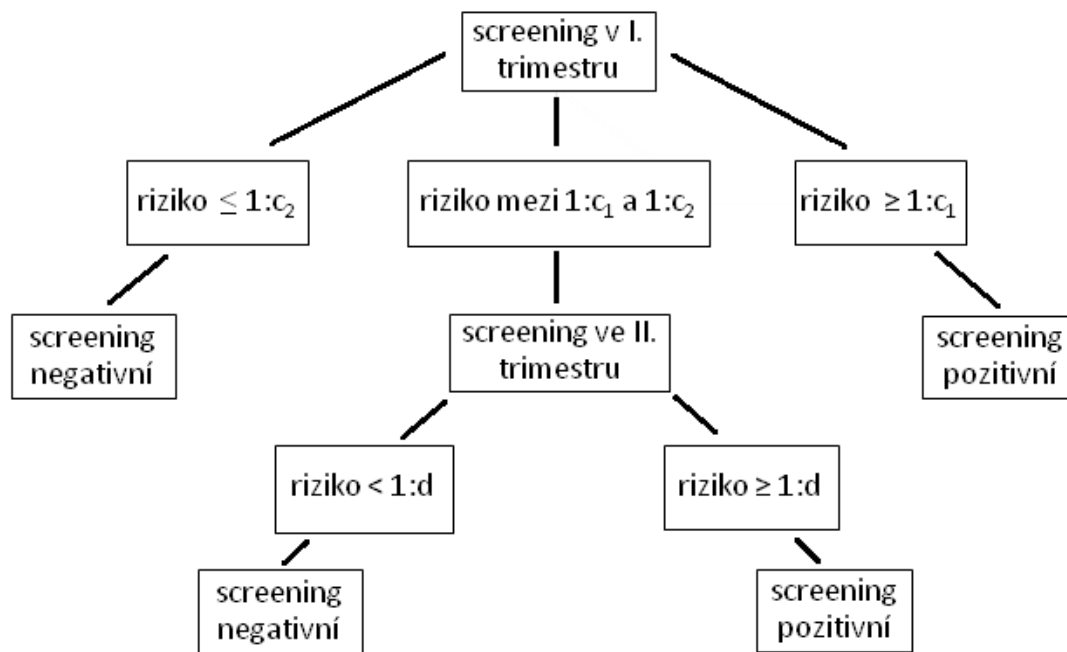
Kontingenční test stanovuje riziko trisomie 21, 18 a 13. Tato forma testu obecně nejprve rozřadí těhotné do tří skupin na ženy s velice vysokým rizikem, středním rizikem a velice nízkým rizikem podle kritérií v první fázi testování. Po této fázi již nejsou ženy s velice nízkým rizikem dále testovány a ženám s velice vysokým rizikem je přímo nabídnuta invazivní prenatální diagnostika. Těhotné se středním rizikem podstupují další fázi testu, v níž jsou rozděleny na skupinu s nízkým a vysokým rizikem. Skupině s vysokým rizikem je nabídnuta jedna z invazivních metod. Kontingenčních testů existuje mnoho druhů, protože je

lze vytvořit prakticky jakoukoliv kombinací screeningových kritérií, které jsou rozděleny do dvou fází testování.

Alternativu pro kombinovaný test představili Christiansen *et Olesen Larsen* (2002). V jejich studii rozdělili těhotné nejprve podle výsledků PAPP-A, fβ-hCG a věkového kritéria na vysoce rizikovou skupinu, kterou tvořilo 1,4 % žen testovaných v této studii, jejíž součástí byly těhotné s rizikem vyšším než 1:65. Těhotné s rizikem nižším než 1:1000, které představovaly 79,2 % testované populace, byly z dalšího testování vyloučeny. Zbylým 19,4 % žen byla změřena šířka NT a nakonec byly rozděleny do dvou skupin s hraničním rizikem 1:400. Při těchto kritériích byla výsledná záchytnost 78,9 % při falešné pozitivitě 4,0 %.

Nicolaides *et al.* (2005) představili jinou formu kontingenčního testu v I. trimestru. V první fázi testování byla kritéria pro rozdělení těhotných věk těhotné, PAPP-A, fβ-hCG a NT. Po této fázi oddělovala nejrizikovější skupinu hodnota rizika 1:100 a nejméně rizikové těhotné riziko 1:1000. Hodnotícími kritérii ve druhé fázi byly ultrazvukové minormarkery, tedy přítomnost či absence nosní kosti, přítomnost či absence trikuspidální regurgitace, nebo abnormální a-vlna ductus venosus. DR bylo 92,0 % (FPR 2,1 %) v případě NB jako dalšího kritéria, 97,2 % (FPR 2,7 %) v případě abnormální a-vlny DV a 91,7 % (FPR 2,7 %), pokud bylo dalším kritériem regurgitace TCV.

Kontingenční test v I. a II. trimestru, který je alternativou integrovaného testu, představili Cuckle *et al.* (2008). Prvním kritériem pro rozdělení těhotných do tří skupin bylo PAPP-A, fβ-hCG, NT v I. trimestru a věk těhotné. V této fázi byly označeny za nejrizikovější těhotné s rizikem větším než 1:30 a naopak nejméně rizikové ženy s rizikem nižším než 1:1500. Zbylé těhotné se středním rizikem byly ve II. trimestru rozděleny podle koncentrací AFP, fβ-hCG, uE₃ a inhibinu A do dvou skupin s hraničním rizikem 1:270. Tento test měl při 4,5% FPR DR 91 %.



Obr. 3. Schéma zobrazující obecně průběh kontingenčního testu v I. a II. trimestru. Rizika $1:c_1$ a $1:c_2$ v první fázi a riziko $1:d$ v druhé fázi jsou zvoleny tak, aby kontingenční test v testované populaci vykazoval nejlepší kombinaci DR a FPR. (Upraveno dle Wright *et al.*, 2004)

2.1.4.5. Sekvenční test

Tento test stanovuje riziko trisomie 21, 18 a 13. Je přijatelnější variantou než integrovaný test, který i při vysokém riziku po testování v I. trimestru umožňuje zakončit test až po výsledcích testování ve II. trimestru. Po výsledcích testování PAPP-A, fβ-hCG a NT v I. trimestru je velice rizikovým těhotným nabídnuta invazivní prenatální diagnostika a zbývající ženy pokračují v testování dále. Po výsledcích biochemických testů ve II. trimestru je ženám s vysokým rizikem nabídnuta amniocentéza. Sekvenční test lze provádět integrací výsledků z obou trimestru i z I. a II. trimestru nezávisle. Samostatná interpretace výsledků z každého trimestru však pouze snižuje detekční schopnost testu a navyšuje jeho falešnou pozitivitu (Herman *et al.*, 2002). (Cuckle *et al.*, 2008)

Ve studii Cuckle *et al.* (2008) dosahovala záchytnost sekvenčního testu při hraničním riziku $1:30$ v I. trimestru a $1:270$ ve II. trimestru 92 % při 5,1% FPR. Což je přibližně srovnatelná hodnota s kontingenčním testem v I. a II. trimestru, který byl v této studii hodnocen také (v kapitole 2.1.4.4).

2.1.4.6. Biochemické testy ve II. trimestru

Double, triple a quadruple test stanovují riziko trisomie 21, 18 a 13 na základě věku těhotné a příslušných biochemických markerů v těchto testech (druhy markerů v jednotlivých testech popsány v kapitole 2.1.2.2.).

Záchytnost double testu je dle studie SURUSS (Wald *et al.*, 2003a) při 5% falešné pozitivitě 66 % u celé molekuly hCG a 71 % při stejné FPR u f β -hCG. U jiné rozsáhlé studie (Wald *et al.*, 2003b) dosahovala DR 61 % při 5% FPR (celá molekula hCG).

U triple testu je dle Wald *et al.* (2003a) záchytnost při 5% FPR u ThCG 74 % a u f β -hCG 77 %. Malone *et al.* (2005) prezentují ve své studii DR 69 % při 5% FPR (celá hCG).

Quadruple test vykazuje u Wald *et al.*, (2003a) DR při 5% FPR u hodnocení ThCG 81 % a u f β -hCG dokonce 83 %. Malone *et al.* (2005) prezentuje u ThCG rovněž 81% DR při 5% FPR. Naopak Wald *et al.* (2003b) poskytuje nižší DR, a to 75 % při 5% FPR při hodnocení ThCG.

2.2. Cílené metody – invazivní

Cílenými metodami se potvrdí či vyvrátí přítomnost aneuploidie, na jejichž možný výskyt ukázal pozitivní výsledek některého ze screeningových programů. Dalšími důvody k indikaci takovéto metody je výskyt chromozomální aberace v předchozím těhotenství, pozitivní rodinná anamnéza a psychologická indikace (Mann *et al.*, 2004). Existuje řada studií zabývajících se neinvazivním testováním aneuploidií z frakce fetální DNA v mateřské plazmě (Chiu *et al.*, 2011; Palomaki *et al.*, 2011). Plošnému využívání této metody v praxi brání především její značná finanční nákladnost (Palomaki *et al.*, 2011). V současnosti jsou proto v praxi k tomuto účelu využívány především dva druhy testů a oba invazivní – odběr choriových klků (CVS) a amniocentéza (AMC). Spíše jako doplňující invazivní prenatální diagnostika slouží kordocentéza. Obecně s sebou nesou tyto metody učitě riziko spontánního potratu (Brumfield *et al.*, 1994). Byly ovšem publikovány i výsledky takové studie, jež neprokázala signifikantní rozdíl v potratovosti těhotných žen, kterým byla provedena amniocentéza oproti těm, kterým provedena nebyla. (Eddleman *et al.*, 2006).

Nejstarší ze tří uvedených metod je amniocentéza. Za účelem karyotypizace byla popsána již v 60. letech (Steele *et al.*, 1966), zatímco CVS (Smidt-Jensen *et al.*, 1984) a kordocentézy (Daffos *et al.*, 1985) se začalo více využívat až s rozvojem ultrazvuku v 80. letech. CVS s tendencí přesunout screening do I. trimestru nachází v praxi stále větší uplatnění. Všechny tři metody se v současnosti provádí za kontroly ultrazvukem.

2.2.1. Odběr choriových klků

Toto vyšetření se provádí v I. trimestru zpravidla mezi 10. a 13. gestačním týdnem (Nicolaidis *et al.*, 1994). Takto ohraničené časové období má své opodstatnění popsané v kapitole 2.1.3.1. U CVS jsou uplatňovány dva postupy – transcervikální (TC) aspirace, nebo transabdominální (TA) biopsie. Výběr přístupu záleží na preferencích lékaře. U transcervikální aspirace se odebírají klky speciální plastovou kanylou nebo katetrem a v případě transabdominální metody je biopsie prováděna punkční jehlou o průměru 18 – 22 Gauge (odpovídá 0,7 – 1,2 mm) (Jackson *et al.*, 1992).

Odběr klků choria má oproti amniocentéze hlavní výhodu v tom, že pokud se těhotná rozhodne v případě postižení plodu těhotenství ukončit, lze tak učinit již v I. trimestru, kdy je riziko komplikací nižší.

Brambati *et al.* (1991) porovnávali bezpečnost transcervikálního a transabdominálního přístupu, ale neprokázali signifikantní rozdíl v potratovosti mezi TC a TA CVS a jejich stanovisko se shodovalo s Jackson *et al.* (1992). Naopak studie Smidt-Jensen *et al.* (1991) prokázala signifikantně vyšší potratovost u TA oproti TC přístupu o 3,9 %. Tento výsledek však mohl být způsoben větší zkušeností s TA CVS, protože autoři z tohoto pracoviště poprvé popsali TA přístup (Smidt-Jensen *et Hahnemann*, 1984).

Při porovnávání potratovosti CVS a AMC dospěli jak Lippman *et al.* (1992), tak Rhoads *et al.* (1989) ke stanovisku, že mezi potratovostí těchto dvou způsobů získávání fetálních buněk není statisticky významný rozdíl. Rhoads *et al.* (1989) však připouští, že s CVS může být spojeno mírně vyšší riziko potratu než s AMC. S tímto stanoviskem však nekorespondují výsledky Ämmälä *et al.* (1993), kteří prokázali signifikantně vyšší potratovost (o 4,4 %) u skupiny po odběru choriových klků. Na tomto výsledku se však mohlo podepsat více opakovaných odběrů u této skupiny než u pacientek, jimž byla provedena AMC.

2.2.2. Amniocentéza

Pojmem amniocentéza se rozumí ambulantní výkon, při němž se punktuje amniální dutina a odebere se vzorek plodové vody (Nussbaum, 2004).

Odběr plodové vody lze provádět ve II. trimestru v závislosti na objemu plodové vody od 15. – 16. gestačního týdne (CERMAT Group, 1998). V horní hranici se různé studie liší, odběr je však limitován zákonnou hranicí pro ukončení těhotenství v případě postiženého plodu s dostatečným předstihem pro zpracování fetálních buněk. Lze provést i tzv. časnou amniocentézu před 15. týdnem. Dnes lze však tento zákrok zaznamenat velmi ojediněle

a nahrazuje se odběrem klků choria, protože bylo potvrzené zvýšené riziko spontánního potratu po provedení časně amniocentézy ve srovnání s druhotrimestrální amniocentézou (CERMAT Group, 1998).

Amniální dutinu lze ve většině případů v době provádění AMC punktovat transabdominálně. Jehlou o vnějším průměru 20 – 22 Gauge (odpovídá 0,7 – 0,9 mm) se v závislosti na týdnu těhotenství odebere 15 – 20 ml plodové vody (CERMAT Group, 1998; Tabor *et al.*, 1986).

Riziko spontánního potratu je o 0,5 – 1 % vyšší oproti těhotným, u nichž amniocentéza provedena nebyla, což dokládá např. Seeds (2004) a Tabor *et al.* (1986). Kromě spontánního potratu je s AMC spojeno riziko předčasného odtoku plodové vody, výskytu infekce či poranění plodu jehlou (Seeds, 2004).

2.2.3. Kordocentéza

Kordocentéza, tedy odběr krve z pupečníku, se provádí v případě selhání kultivace buněk získaných z CVS nebo AMC či při nejednoznačném výsledku karyotypizace např. vlivem mozaicismu. Amniocentéza se v tomto případě již neopakuje a přistupuje se ke kordocentéze. K odběru se používá jehla o vnějším průměru 20 – 22 Gauge (odpovídá 0,7 – 0,9 mm) a délky 9 – 12 cm. Pro odběr slouží 1 – 2 ml krve (Tongsong *et al.*, 2000). Kordocentéza se provádí od 17. až 18. týdne, protože u dřívějšího provedení byly zaznamenány mnohem vyšší fetální ztráty (Orlandi *et al.*, 1990). Horní hranice provedení kordocentézy za účelem karyotypizace je přibližně 22. – 23. týden, aby byl před zákonnou hranicí 24. týdne pro ukončení těhotenství v případě postiženého plodu dostatek času ke zpracování vzorků. (Brumfield *et Atkinson*, 1994)

Komplikace spojené s kordocentézou jsou především fetální bradykardie, krvácení z místa odběru, intrauterinní úmrtí plodu, spontánní potrat, předčasný porod, intrauterinní růstová retardace a jsou závislé na zkušenosti operátéra (Tongsong *et al.*, 2000). Riziko fetálních ztrát zahrnující spontánní potrat a intrauterinní úmrtí plodu se pohybuje okolo 2 %, což dokládají Hickok *et Mills* (1992) a Buscaglia *et al.* (1996)

3. Metodika vyhodnocování vzorků získaných invazivní prenatální diagnostikou

Nejstarší vyhodnocovací metodou prenatální diagnostiky je metoda klasické cytogenetiky. Postupem času byly vyvinuty další metody, které umožňují rozpoznat aneuploidie, z nichž se nyní využívají hlavně QF-PCR a případně FISH. U těchto metod je však stále zaznamenáváno určité procento selhání při vyhodnocování výsledků. Z tohoto důvodu jsou doprovázeny klasickou cytogenetickou analýzou (duální testování).

3.1. Klasická cytogenetická metoda

Tato metoda je využívána již od vzniku prenatální diagnostiky a pro svou spolehlivost stále doprovází novější techniky. Kromě detekce numerických aberací umožňuje rozpoznat také strukturní aberace. Její velkou nevýhodou je však dlouhá doba kultivace amniocytů či buněk choriových klků, která trvá přibližně dva týdny. Před skončením kultivace je do kultivačního média přidán kolchicin k zastavení buněčného dělení v metafázi. Následně jsou metafázické chromozomy barveny různými barvicími technikami, z nichž nejčastější je G-pruhování (G banding). Nakonec jsou chromozomy seřazeny a pozorovány pod mikroskopem. (Hulten *et al.*, 2003)

Během G-pruhování se na chromozomy nejprve krátce působí trypsinem, který způsobí částečnou degradaci proteinové složky, a následně jsou obarveny roztokem Giemsky. Výsledkem jsou chromozomy s tmavými pruhy. Mezi nimi jsou pruhy světlé. Toto pruhování je pro každý chromozom charakteristické. (Francke *et Oliver*, 1978)

3.2. QF-PCR

Tato metoda využívá k detekci aneuploidií amplifikace markerů STR (short tandem repeats) lokusů – vysoce polymorfních nekódujících repetitivních sekvencí genomu. Poprvé ji v prenatální diagnostice představil Mansfield (1993) a stala se rychlou alternativou ke klasické cytogenetické metodě. Nyní je nejčastěji používaná multiplexní QF-PCR, která je charakteristická namnožením více produktů během samotné PCR reakce. Standardně jsou to současně markery (STR lokusy) autozomů 21, 18 a 13 a zároveň gonozomů X a Y. Samotná analýza je hotová do jednoho dne, protože nevyžaduje kultivaci buněk. (Cirigliano *et al.*, 2001)

Před samotnou QF-PCR je DNA nejprve extrahována, poté jsou přidány nezbytné komponenty pro správný průběh polymerázové řetězcové reakce – templátová DNA,

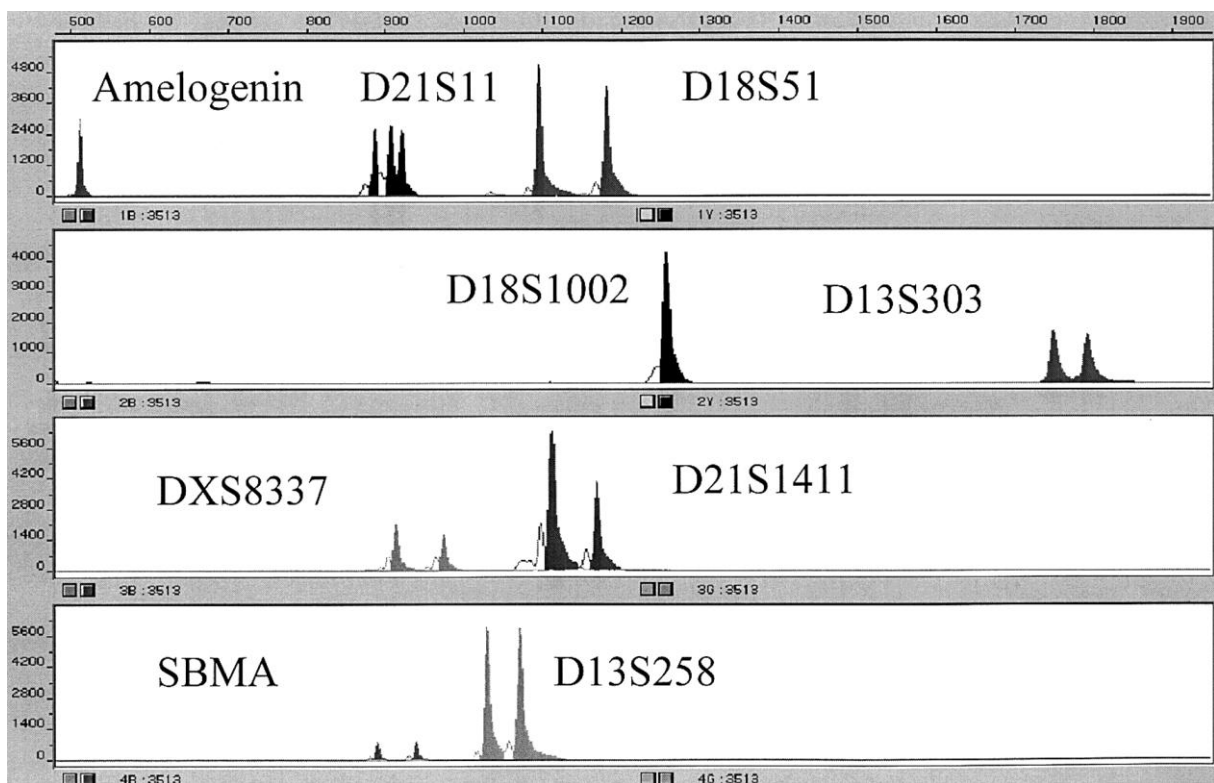
Taq polymeráza, fluorescenčně značené primery navržené pouze pro chromozomy 13, 18, 21, X, Y, deoxyribonukleotidy a pufr s hořčičnými ionty (Bili *et al.*, 2002). V tomto složení proběhně úvodní denaturace při 95°C následována 25 – 30 opakujícími se cykly. Jeden cyklus zahrnuje krátce denaturaci při 94°C, annealing (hybridizace primerů) při teplotě okolo 57°C a elongaci při teplotě okolo 72°C. Následuje závěrečná elongace při 72°C. Během denaturace jsou od sebe odděleny dva řetězce templátové DNA, na něž během annealingu nasedají specificky připravené primery. V poslední fázi dochází k elongaci řetězce, který je třeba k následné analýze. Namnožené produkty PCR reakce jsou kapilární elektroforézou separovány a je u nich detekován fluorescenční signál. (Cirigliano *et al.*, 2001)

Pro získání dostatečné informace o výskytu příslušné aneuploidie, jsou nutné minimálně dva informativní markery na chromozomu 13, 18, 21, X a Y. Markery jsou informativní, jsou-li na jednom chromozomu v heterozygotní kombinaci. Pokud se vyskytují v homozygotní kombinaci, je třeba použít jiné markery, kterými se docílí heterozygotní formy. Primery musí být specificky navrženy tak, aby se v příslušné testované populaci vyskytlo co nejméně neinformativních markerů. STR lokusy se totiž v zeměpisně odlišných populacích liší. Např. pro českou populaci byly navrženy primery zobrazené v tabulce 1. (Putzova *et al.*, 2008)

Tab. 1: Složení markerů pro detekci trisomií chromozomu 13, 18, 21 a heterochromozomů navržených pro českou populaci pro jednu reakci multiplexní QF-PCR (Upraveno podle Putzova *et al.*, 2008)

Chromozom	Marker	Pozice	Chromozom	Marker	Pozice
13	D13S258	13q21.33-q22.1	X/Y	AMX/AMY	Xp22.2/Yp11.2
	D13S305	13q13.3		DXS1189	15 Xp22.2
	D13S628	13q31.1		DXS7424	Xq22.1
	D13S631	13q32.1		DXS8377	Xq28
	D13S742	13q12.12		DXS981	Xq13.1
18	D18S1002	18q11.2		SRY	Yp11.31
	D18S386	18q22.1		X22	Xq28/Yq12
	D18S391	18p11.31		XHPRT	Xq26.2
	D18S51	18q21.33		Markery použité v případě neinformativního výsledku	
	D18S535	18q12.3			
21	D21S11	16 21q21.1	13	D13S634	13q21.33
	D21S1411	21q22.3		D13S762	13q31.3
	D21S1412	21q22.2		D13S788	13q14.3
	D21S1432	21q21.1	18	D18S879	18q22.3
	D21S1435	21q21.3		D18S978	18q12.3
	D21S1437	21q21.1		D18S1367	18q22.1

Podle množství fluorescenčního signálu při určité vlnové délce je vyhodnocována přítomnost příslušné aneuploidie. Výskyt trisomie je charakterizován trialeickou formou trisomie nebo dialeickou formou trisomie. U trialeické formy trisomie je poměr peaků alel 1:1:1 a u dialeické formy trisomie je to 2:1 (Mann *et al.*, 2001). Euploidní plody jsou charakteristické dialeickou formou disomie v poměru 1:1. V případě výskytu neinformativního markeru homozygotní formy je fluorescenční signál, který by byl rozložen do dvou peaků, zobrazen ve formě jednoho peaku, a ten je proto dvakrát vyšší. U Turnerova syndromu je pouze jeden peak standardní velikosti u X a žádný u Y (Cirigliano *et al.*, 1999). Triploidie se na výstupu chová jako trisomie u chromozomů 13, 18 i 21 a zároveň buď trisomie X, disomie X a monosomie Y, nebo monosomie X a disomie Y (Bili *et al.*, 2002). Analogicky se projevují syndromy s genotypem 47, XXY či 47, XYY počtem svých peaků podle počtu vyskytujících se gonozomů nebo dvojnásobným navýšením peaku v případě homozygoty u markeru na chromozomu X, resp. Y (Cirigliano *et al.*, 1999).



Obr. 4. Elektroforetogram znázorňující vzorek plodu s trisomií chromozomu 21 po proběhlé reakci QF-PCR. Osa x znázorňuje délku produktů z PCR reakce v arbitrárních jednotkách. Osa y ukazuje intenzitu fluorescenčního signálu v rozdílných měřítcích. Tři peaky u markeru D21S11 a poměr peaku 2:1 u markeru D21S1411 ukazují na 3 chromozomy 21. (Převzato ze Schmidt *et al.*, 2000)

V detekci aneuploidií chromozomů 13, 18, 21, X a Y se senzitivita QF-PCR pohybuje mezi 98 a 100 %, což dokládá např. (Cirigliano *et al.*, 2009). Specifita je ve většině případů 100 % a zmíněná studie tento výsledek potvrzuje.

3.3. FISH

Zavedení fluorescenční in situ hybridizace do prenatalní diagnostiky znamenalo značné urychlení analýzy vzorků oproti klasické barvicí technice. FISH lze totiž provádět na interfazních jádrech, a proto buňky nevyžadují kultivaci (Klinger *et al.*, 1992). Pomocí této techniky je analýza hotová zpravidla do jednoho dne (Eiben *et al.*, 1999). Principem FISH je hybridizace fluorescenčně značených sond ke komplementárním sekvencím příslušných chromozomů. Tyto sekvence lze následně vizualizovat.

Před samotnou FISH jsou buňky oddělené centrifugací přeneseny na mikroskopické sklíčko, kde jsou fixovány. Během FISH jsou přidány specifické DNA sondy komplementární k oblastem na pěti vyšetřovaných chromozomech – 13, 18, 21, X a Y. K proběhnutí denaturace templátové DNA i sondy je nutno na několik minut zvýšit teplotu na přibližně 80°C. Následně je směs většinou přes noc inkubovaná při 37°C, aby mohly sonda a templátová DNA hybridizovat. Nakonec je vzorek analyzován pomocí fluorescenčního mikroskopu. Dle počtu svítících míst je posouzena přítomnost dvou či tří analyzovaných chromozomů ve vzorku. Podle počtu markerů gonozomů jsou analogicky posouzeny aneuploidie gonozomů. (Klinger *et al.*, 1992)

K odhalení numerických aberací pomocí FISH jsou využívány centromera-specifické (α -satelitní) sondy, hybridizující s repetitivními sekvencemi v oblasti centromery a lokus-specifické sondy (Pergament *et al.*, 2000). Chromozomy 13 a 21 sdílí stejnou repetitivní oblast, a proto je nelze rozlišit pomocí α -satelitních sond (Klinger *et al.*, 1992). DNA sondy mohou být fluorescenčně značené více barvami, což umožní posouzení více druhů aneuploidií v jednom vzorku. Tato technika je nazývána mFISH (Multicolor FISH) (Liehr *et al.*, 2006). Pro analýzu nejčastějších aneuploidií byly vyvinuty komerčně dostupné kity např. AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit (<http://www.abbottmolecular.com/us/products/genetics/fish/prenatal-genetics-testing-aneuvysion.html>). Tento kit obsahuje sondy komplementární k následujícím chromozomům v daných oblastech: chromozom 18 (18p11.1 – q11.1), chromozom X (Xp11.1 – q11.1), chromozom Y (Yp11.1 – q11.1), chromozom 13 (13q14 – oblast genu pro retinoblastom) a chromozom 21 (21q22.13 – q22.2).

FISH vykazuje vysokou senzitivitu i specifitu. Dle Teppenberga *et al.*, (2001) je senzitivita pro všechny zjištěné aneuploidie 99,8 % a specifita 99,98 %. Vysokou spolehlivost této metody při detekci aneuploidií potvrzuje většina studií. U Weremowicz *et al.* (2001) však byly publikovány nižší výsledky. V této studii dosahovala senzitivita 94 a specifita 98 % za použití stejného kitu jako u Teppenberga *et al.* (2001). Tyto výsledky mohly být způsobeny menším počtem vyšetřovaných vzorků oproti studii Teppenberga *et al.* (2001).

Překážkou při analýze pomocí FISH může být kontaminace vzorku mateřskými buňkami, pokud je plod ženského pohlaví, protože tyto dvě linie od sebe nelze rozlišit. Komerčně dostupné kity obsahující sondy pro pět analyzovaných chromozomů představují problém v tom, že obsahují částečné konstituční heteromorfismy, což může vést k falešně pozitivnímu nebo falešně negativnímu výsledku. (Hulten *et al.*, 2003)

4. Závěr

Kvalita metod prenatální diagnostiky se neustále zvyšuje. Objev efektivních biochemických a ultrazvukových markerů umožnil nejprve zvýšení záchytnosti aneuploidií ve II. trimestru a následně i v I. trimestru, což zapříčinilo posun diagnostiky těchto aberací do ranějšího stadia těhotenství, kdy je riziko komplikací s ukončením těhotenství nižší. Existence těchto screeningových markerů dala vzniknout několika druhům screeningových programů, které se dle hodnocených markerů liší v záchytnosti aneuploidií. Nejúčinnější screeningový program je integrovaný test kombinující markery I. i II. trimestru. Pokud je však prvotrimestrální vyšetření pozitivní, provádí se na přání pacientky diagnostické invazivní vyšetření (CVS) bezprostředně.

Významným vývojem prošly rovněž metody hodnotící fetální DNA. Zavedení molekulárně-cytogenetických a molekulárně-genetických metod do prenatální diagnostiky umožnilo významně urychlit posuzování přítomnosti aneuploidií.

Protože se věk těhotných žen neustále zvyšuje, dá se předpokládat, že prenatální diagnostika bude hrát stále důležitější úlohu v záchytu nejčastějších aneuploidií, jejichž výskyt s věkem těhotných narůstá.

5. Seznam zkratek a slovníček pojmů

AFP – α -fetoprotein

AMC – amniocentéza

CRL (crown-rump length) – temeno-kostrční délka

CVS (chorionic villus sampling) – odběr choriových klků

DR (Detection Rate) – procento detekce, záchytnost – podíl skutečně postižených a těch, které test označil za postižené

DV – ductus venosus

FISH (fluorescence in situ hybridization) – fluorescenční in situ hybridizace

FMF úhel (frontomaxillary facial angle) – frontomaxilární obličejový úhel

FPR (False Positive Rate) – procento falešné positivity – procento zdravých, kteří byli testem označeni za postižené

f β -hCG (free β -hCG) – volná β -podjednotka lidského choriového gonadotropin

hCG (human chorionic gonadotropin) – lidský choriový gonadotropin

MoM (Multiple of Median) – násobek mediánu, v bakalářské práci je tento násobek u aneuploidních plodů vždy vztažen na 1 MoM euploidních plodů, i když to v textu není uvedeno

NB (nasal bone) – nosní kost

NT – nuchální translucence

PAPP-A – Pregnancy-associated plasma protein A

QF-PCR (quantitative fluorescent polymerase chain reaction) – kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězcová reakce

senzitivita – úspěšnost, s níž test zachytí přítomnost aneuploidie; pravděpodobnost, že pozitivní test odhalil zasaženého pacienta

specifita – schopnost testu přesně vybrat případy, u nichž aneuploidie nenastala

STR (short tandem repeats) – krátké tandemové repetice

SUA (single umbilical artery) – jedna umbilikální arterie

SURUSS – Serum Urine and Ultrasound Screening Study

TA – transabdominální

TC – transcervikální

TCV (tricuspid valve) – trikuspidální chlopeň

ThCG – celá molekula lidského choriového gonadotropinu

uE₃ – nekonjugovaný estriol

aplázie – nevyvinutí některého orgánu

ascites – hromadění tekutiny v dutině břišní

atrézie – slepé ukončení

brachycefalie – defekt lebky způsoben předčasným srůstem koronárních švů

echogenní orgán – orgán s dostatečnou odrazivostí pro vytvoření znatelného obrazu při sonografickém vyšetření

hernie bránice – brániční kýla, defekt nebo otvor v bránici, který umožňuje obsahu dutiny břišní putovat do dutiny hrudní

holoprosencefalie – nevytvoření nebo neúplné oddělení jedné mozkové hemisféry

hydronefróza – rozšíření ledvinné pánvičky

hyperechogenní orgán – orgán se zvýšenou odrazivostí, jeví se na ultrazvuku světlejší než okolí

hypoplázie – neúplné vyvinutí některého orgánu

klinodaktylie – malformace prstů, prsty vybočují z osy

koarktace aorty – zúžení aorty

megacystis – abnormálně zvětšený močový měchýř

mikrocefalie – zakrnění či předčasné ukončení růstu mozku a celé hlavy

mikrognatie – zmenšení dolní čelisti

myelomeningokéla – struktury míchy jsou mimo páteřní kanál a nejsou kryté kůží

nuchální cystický hygrom – cystické zduření v oblasti krku

nuchální edém – abnormální nahromadění tekutiny v oblasti šíje

omfalokéla – defekt uzavření břišní stěny; střeva, játra a případně další orgány jsou uzavřeny ve vaku vně dutinu břišní

postaxiální polydaktylie – nadpočetný 4. prst či malíček

syndaktylie – srostlé prsty

ventrikulomegálie – rozšíření komorového systému způsobené zmnožením mozkomíšního moku bez redukce mozkové tkáně

6. Seznam použité literatury

- Ämmälä, P., Hiilesmaa, V.K., Liukkonen, S., Saisto, T., Teramo, K., Koskull, H.V. (1993). Randomized trial comparing first-trimester transcervical chorionic villus sampling and second-trimester amniocentesis. *Prenatal Diagnosis*, 13, 919–927.
- Benacerraf, B.R., Gelman, R., Frigoletto, F.D. (1987). Sonographic identification of second-trimester fetuses with Down's syndrome. *New England Journal of Medicine*, 317, 1371–1376.
- Berry, E., Aitken, D.A., Crossley, J.A., Macri, J.N., Connor, J.M. (1997). Screening for Down's syndrome: changes in marker levels and detection rates between first and second trimesters. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 104, 811–817.
- Bili, C., Divane, A., Apeessos, A., Konstantinos, T., Apostolos, A., Ioannis, B., Periklis, T., Florentin, L. (2002). Prenatal diagnosis of common aneuploidies using quantitative fluorescent PCR. *Prenatal Diagnosis*, 22, 360–365.
- Bindra, R., Heath, V., Liao, A., Spencer, K., Nicolaides, K.H. (2002). One-stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11–14 weeks: a prospective study of 15 030 pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 20, 219–225.
- Brambati, B., Terzian, E., Tognoni, G. (1991). Randomized clinical trial of transabdominal versus transcervical chorionic villus sampling methods. *Prenatal Diagnosis*, 11, 285–293.
- Brambati, B., Macintosh, M.C.M., Teisner, B., Maguiness, S., Shrimanker, K., Lanzani, A., Bonacchi, I., Tului, L., Chard, T., Grudzinskas, J.G. (1993). Low maternal serum levels of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) in the first trimester in association with abnormal fetal karyotype. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 100, 324–326.
- Brumfield, C.G.M., Atkinson, M.W.M. (1994). Invasive techniques for fetal evaluation and treatment. *Clinical Obstetrics & Gynecology*, 37, 856–874.
- Buscaglia, M., Ghisoni, L., Bellotti, M., Ferrazzi, E., Levi-Setti, P., Marconi, A.M., Taglioretti, A., Zamperini, P., Pardi, G. (1996). Percutaneous umbilical blood sampling: indication changes and procedure loss rate in a nine years' experience. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 11, 106–113.
- CERMAT Group (1998). Randomised trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis. *The Lancet*, 351, 242–247.
- Cicero, S., Curcio, P., Papageorghiou, A., Sonek, J., Nicolaides, K. (2001). Absence of nasal bone in fetuses with trisomy 21 at 11–14 weeks of gestation: an observational study. *The Lancet*, 358, 1665–1667.
- Cicero, S., Rembouskos, G., Vandecruys, H., Hogg, M., Nicolaides, K.H. (2004a). Likelihood ratio for trisomy 21 in fetuses with absent nasal bone at the 11–14-week scan. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 23, 218–223.

- Cicero, S., Curcio, P., Rembouskos, G., Sonek, J., Nicolaides, K.H. (2004b). Maxillary length at 11–14 weeks of gestation in fetuses with trisomy 21. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 24, 19–22.
- Cirigliano, V., Sherlock, J., Conway, G., Quilter, C., Rodeck, C., Adinolfi, M. (1999). Rapid detection of chromosomes X and Y aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Prenatal Diagnosis*, 19, 1099–1103.
- Cirigliano, V., Ejarque, M., Cañadas, M.P., Lloveras, E., Plaja, A., Perez, M. del M., Fuster, C., Egozcue, J. (2001). Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. *Molecular Human Reproduction*, 7, 1001–1006.
- Cirigliano, V., Voglino, G., Ordoñez, E., Marongiu, A., Paz Cañadas, M., Ejarque, M., Rueda, L., Lloveras, E., Fuster, C., Adinolfi, M. (2009). Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. *Prenatal Diagnosis*, 29, 40–49.
- Cuckle, H.S. (2002). Growing complexity in the choice of Down's syndrome screening policy. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 19, 323–326.
- Cuckle, H.S., Malone, F.D., Wright, D., Porter, T.F., Nyberg, D.A., Comstock, C.H., Saade, G.R., Berkowitz, R.L., Ferreira, J.C., Dugoff, L., *et al.* (2008). Contingent screening for Down syndrome—results from the FaSTER trial. *Prenatal Diagnosis*, 28, 89–94.
- Daffos, F., Capella-Pavlovsky, M., Forestier, F. (1985). Fetal blood sampling during pregnancy with use of a needle guided by ultrasound: a study of 606 consecutive cases. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 153, 655–660.
- Eddleman, K.A., Malone, F.D., Sullivan, L., Dukes, K., Berkowitz, R.L., Kharbutli, Y., Porter, T.F., Luthy, D.A., Comstock, C.H., Saade, G.R., *et al.* (2006). Pregnancy loss rates after midtrimester amniocentesis. *Obstetrics & Gynecology*, 108, 1067–1072.
- Eiben, B., Trawicki, W., Hammans, W., Goebel, R., Pruggmayer, M., Epplen, J.T. (1999). Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 14, 193–197.
- Faiola, S., Tsoi, E., Huggon, I.C., Allan, L.D., Nicolaides, K.H. (2005). Likelihood ratio for trisomy 21 in fetuses with tricuspid regurgitation at the 11 to 13 + 6-week scan. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 26, 22–27.
- Firth, H.V., Huson, S.M., Boyd, P.A., Chamberlain, P.F., MacKenzie, I., Morriss-Kay, G.M. (1994). Analysis of limb reduction defects in babies exposed to chorionic villus sampling. *The Lancet*, 343, 1069–1071.
- Francke, U., Oliver, N. (1978). Quantitative analysis of high-resolution trypsin-Giemsa bands on human prometaphase chromosomes. *Human Genetics*, 45, 137–165.
- Haddow, J.E., Palomaki, G.E., Knight, G.J., Williams, J., Pulkkinen, A., Canick, J.A., Saller, D.N., Bowers, G.B. (1992). Prenatal screening for Down's syndrome with use of maternal serum markers. *New England Journal of Medicine*, 327, 588–593.

- Herman, A., Dreazen, E., Tovbin, J., Weinraub, Z., Bukovsky, Y., Maymon, R. (2002). Comparison between disclosure and non-disclosure approaches for trisomy 21 screening tests. *Human Reproduction*, 17, 1358–1362.
- Hickok, D.E., Mills, M. (1992). Percutaneous umbilical blood sampling: Results from a multicenter collaborative registry. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 166, 1614–1618.
- Huggon, I.C., Ghi, T., Cook, A.C., Zosmer, N., Allan, L.D., Nicolaides, K.H. (2002). Fetal cardiac abnormalities identified prior to 14 weeks' gestation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 20, 22–29.
- Huggon, I.C., DeFigueiredo, D.B., Allan, L.D. (2003). Tricuspid regurgitation in the diagnosis of chromosomal anomalies in the fetus at 11-14 weeks of gestation. *Heart*, 89, 1071–1073.
- Chiu, R.W.K., Akolekar, R., Zheng, Y.W.L., Leung, T.Y., Sun, H., Chan, K.C.A., Lun, F.M.F., Go, A.T.J.I., Lau, E.T., To, W.W.K., *et al.* (2011). Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ: British Medical Journal*, 342.
- Christiansen, M., Olesen Larsen, S. (2002). An increase in cost-effectiveness of first trimester maternal screening programmes for fetal chromosome anomalies is obtained by contingent testing. *Prenatal Diagnosis*, 22, 482–486.
- Christiansen, M., Pihl, K., Hedley, P.L., Gjerris, A.-C., Lind, P.Ø., Larsen, S.O., Krebs, L., Larsen, T. (2010). ADAM 12 may be used to reduce the false positive rate of first trimester combined screening for Down syndrome. *Prenatal Diagnosis*, 30, 110–114.
- Jackson, L.G., Zachary, J.M., Fowler, S.E., Desnick, R.J., Golbus, M.S., Ledbetter, D.H., Mahoney, M.J., Pergament, E., Simpson, J.L., Black, S., *et al.* (1992). A randomized comparison of transcervical and transabdominal chorionic-villus sampling. *New England Journal of Medicine*, 327, 594–598.
- Kagan, K.O., Wright, D., Baker, A., Sahota, D., Nicolaides, K.H. (2008). Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 31, 618–624.
- Klinger, K., Landes, G., Shook, D., Harvey, R., Lopez, L., Locke, P., Lerner, T., Osathanondh, R., Leverone, B., Houseal, T., *et al.* (1992). Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *American Journal of Human Genetics*, 51, 55–65.
- Laigaard, J., Sørensen, T., Fröhlich, C., Pedersen, B.N., Christiansen, M., Schiøtt, K., Uldbjerg, N., Albrechtsen, R., Clausen, H.V., Ottesen, B., *et al.* (2003). ADAM12: a novel first-trimester maternal serum marker for Down syndrome. *Prenatal Diagnosis*, 23, 1086–1091.
- Laigaard, J., Spencer, K., Christiansen, M., Cowans, N.J., Larsen, S.O., Pedersen, B.N., Wewer, U.M. (2006). ADAM 12 as a first-trimester maternal serum marker in screening for Down syndrome. *Prenatal Diagnosis*, 26, 973–979.

- Liao, A.W., Sebire, N.J., Geerts, L., Cicero, S., Nicolaides, K.H. (2003). Megacystis at 10–14 weeks of gestation: chromosomal defects and outcome according to bladder length. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 21, 338–341.
- Liehr, T., Starke, H., Heller, A., Kosyakova, N., Mrasek, K., Gross, M., Karst, C., Steinhäuser, U., Hunstig, F., Fickelscher, I., *et al.* (2006). Multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH) applied to FISH-banding. *Cytogenetic and Genome Research*. 114, 240–244.
- Lippman, A., Tomkins, D.J., Shime, J., Hamerton, J.L. (1992). Canadian multicentre randomized clinical trial of chorion villus sampling and amniocentesis: Final report. *Prenatal Diagnosis*, 12, 385–408.
- Van Lith, J.M.M., Pratt, J.J., Beekhuis, J.R., Mantingh, A. (1992). Second-trimester maternal serum immunoreactive inhibin as a marker for fetal Down's syndrome. *Prenatal Diagnosis*, 12, 801–806.
- Longo, D., DeFigueiredo, D., Cicero, S., Sacchini, C., Nicolaides, K.H. (2004). Femur and humerus length in trisomy 21 fetuses at 11–14 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 23, 143–147.
- Macri, J.N., Kasturi, R.V., Krantz, D.A., Cook, E.J., Moore, N.D., Young, J.A., Romero, K., Larsen Jr., J.W. (1990). Maternal serum Down syndrome screening: Free β -protein is a more effective marker than human chorionic gonadotropin. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 163, 1248–1253.
- Maiz, N., Valencia, C., Kagan, K.O., Wright, D., Nicolaides, K.H. (2009). Ductus venosus Doppler in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11–13 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 33, 512–517.
- Malone, F.D., Canick, J.A., Ball, R.H., Nyberg, D.A., Comstock, C.H., Bukowski, R., Berkowitz, R.L., Gross, S.J., Dugoff, L., Craigo, S.D., *et al.* (2005). First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *New England Journal of Medicine*, 353, 2001–2011.
- Mann, K., Fox, S.P., Abbs, S.J., Yau, S.C., Scriven, P.N., Docherty, Z., Ogilvie, C.M. (2001). Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. *The Lancet*, 358, 1057–1061.
- Mann, K., Donaghue, C., Fox, S.P., Docherty, Z., Ogilvie, C.M. (2004). Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *European Journal of Human Genetics*, 12, 907–915.
- Mansfield, E.S. (1993). Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Human Molecular Genetics*, 2, 43–50.
- Matias, A., Huggon, I., Areias, J.C., Montenegro, N., Nicolaides, K.H. (1999). Cardiac defects in chromosomally normal fetuses with abnormal ductus venosus blood flow at 10–14 weeks. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 14, 307–310.

- Merkatz, I.R., Nitowsky, H.M., Macri, J.N., Johnson, W.E. (1984). An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 148, 886–894.
- Nicolaides, K.H. (2003). Screening for chromosomal defects. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 21, 313–321.
- Nicolaides, K., Brizot, M., Patel, F., Snijders, R. (1994). Comparison of chorionic villus sampling and amniocentesis for fetal karyotyping at 10-13 weeks' gestation. *The Lancet*, 344, 435–439.
- Nicolaides, K.H., Azar, G., Byrne, D., Mansur, C., Marks, K. (1992a). Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ: British Medical Journal*, 304, 867–869.
- Nicolaides, K.H., Snijders, R.J.M. *et al.* (1992b). Ultrasonographically detectable markers of fetal chromosomal abnormalities. *The Lancet*, 340, 704–707.
- Nicolaides, K.H., Spencer, K., Avgidou, K., Faiola, S., Falcon, O. (2005). Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 25, 221–226.
- Nussbaum, R.L. (2004). *Klinická genetika: Thompson & Thompson: 6. vydání* (Praha: Triton).
- Orlandi, F., Damiani, G., Jakil, C., Lauricella, S., Bertolino, O., Maggio, A. (1990). The risks of early cordocentesis (12–21 weeks): Analysis of 500 procedures. *Prenatal Diagnosis*, 10, 425–428.
- Palomaki, G.E., Haddow, J.E., Knight, G.J., Wald, N.J., Kennard, A., Canick, J.A., Saller, D.N., Blitzer, M.G., Dickerman, L.H., Fisher, R., *et al.* (1995). Risk-based prenatal screening for trisomy 18 using alpha-fetoprotein, unconjugated oestriol and human chorionic gonadotropin. *Prenatal Diagnosis*, 15, 713–723.
- Palomaki, G.E., Kloza, E.M., Lambert-Messerlian, G.M., Haddow, J.E., Neveux, L.M., Ehrich, M., van den Boom, D., Bombard, A.T., Deciu, C., Grody, W.W., *et al.* (2011). DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study. *Genetics in Medicine*, 13, 913–920.
- Pergament, E., Xien Chen, P., Thangavelu, M., Fiddler, M. (2000). The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, 20, 215–220.
- Poon, L.C.Y., Chelemen, T., Minekawa, R., Frisova, V., Nicolaides, K.H. (2009). Maternal serum ADAM12 (A disintegrin and metalloprotease) in chromosomally abnormal pregnancy at 11-13 weeks. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 200, 508.e1–508.e6.
- Putzova, M., Pecnova, L., Dvorakova, L., Soldatova, I., Goetz, P., Stejskal, D. (2008). OmniPlex—a new QF-PCR assay for prenatal diagnosis of common aneuploidies based on evaluation of the heterozygosity of short tandem repeat loci in the Czech population. *Prenatal Diagnosis*, 28, 1214–1220.

- Rembouskos, G., Cicero, S., Longo, D., Sacchini, C., Nicolaides, K.H. (2003). Single umbilical artery at 11–14 weeks' gestation: relation to chromosomal defects. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 22, 567–570.
- Rhoads, G.G., Jackson, L.G., Schlesselman, S.E., de la Cruz, F.F., Desnick, R.J., Golbus, M.S., Ledbetter, D.H., Lubs, H.A., Mahoney, M.J., Pergament, E., *et al.* (1989). The safety and efficacy of chorionic villus sampling for early prenatal diagnosis of cytogenetic abnormalities. *New England Journal of Medicine*, 320, 609–617.
- Sacchini, C., El-Sheikhah, A., Cicero, S., Rembouskos, G., Nicolaides, K.H. (2003). Ear length in trisomy 21 fetuses at 11–14 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 22, 460–463.
- Seeds, J.W. (2004). Diagnostic mid trimester amniocentesis: How safe? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 191, 607–615.
- Schmidt, W., Jenderny, J., Hecher, K., Hackelöer, B.-J., Kerber, S., Kochhan, L., Held, K.R. (2000). Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. *Molecular Human Reproduction*, 6, 855–860.
- Smidt-Jensen, S., Hahnemann, N. (1984). Transabdominal fine needle biopsy from chorionic villi in the first trimester. *Prenatal Diagnosis*, 4, 163–169.
- Smidt-Jensen, S., Permin, M., Philip, J. (1991). Sampling success and risk by transabdominal chorionic villus sampling, transcervical chorionic villus sampling and amniocentesis: a randomized study. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 1, 86–90.
- Snijders, R., Noble, P., Sebire, N., Souka, A., Nicolaides, K. (1998). UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *The Lancet*, 352, 343–346.
- Snijders, R.J.M., Sebire, N.J., Nayar, R., Souka, A., Nicolaides, K.H. (1999). Increased nuchal translucency in trisomy 13 fetuses at 10–14 weeks of gestation. *American Journal of Medical Genetics*, 86, 205–207.
- Sonek, J. (2007). First trimester ultrasonography in screening and detection of fetal anomalies. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 145C, 45–61.
- Sonek, J., Borenstein, M., Dagklis, T., Persico, N., Nicolaides, K.H. (2007). Frontomaxillary facial angle in fetuses with trisomy 21 at 11–13 weeks. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 196, 271.e1–271.e4.
- Souka, A.P., Pilalis, A., Kavalakis, Y., Kosmas, Y., Antsaklis, P., Antsaklis, A. (2004). Assessment of fetal anatomy at the 11–14-week ultrasound examination. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 24, 730–734.
- Spencer, K. (2007). Aneuploidy screening in the first trimester. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 145C, 18–32.

- Spencer, K., Ong, C., Skentou, H., W. Liao, A., H. Nicolaides, K. (2000a). Screening for trisomy 13 by fetal nuchal translucency and maternal serum free β -hCG and PAPP-A at 10–14 weeks of gestation. *Prenatal Diagnosis*, 20, 411–416.
- Spencer, K., Tul, N., Nicolaides, K.H. (2000b). Maternal serum free β -hCG and PAPP-A in fetal sex chromosome defects in the first trimester. *Prenatal Diagnosis*, 20, 390–394.
- Spencer, K., Liao, A.W.J., Skentou, H., Cicero, S., Nicolaides, K.H. (2000c). Screening for triploidy by fetal nuchal translucency and maternal serum free β -hCG and PAPP-A at 10–14 weeks of gestation. *Prenatal Diagnosis*, 20, 495–499.
- Spencer, K., Crossley, J.A., Aitken, D.A., Nix, A.B.J., Dunstan, F.D.J., Williams, K. (2002). Temporal changes in maternal serum biochemical markers of trisomy 21 across the first and second trimester of pregnancy. *Annals Of Clinical Biochemistry*, 39, 567–576.
- Spencer, K., Crossley, J.A., Aitken, D.A., Nix, A.B.J., Dunstan, F.D.J., Williams, K. (2003). The effect of temporal variation in biochemical markers of trisomy 21 across the first and second trimesters of pregnancy on the estimation of individual patient-specific risks and detection rates for Down’s syndrome. *Annals Of Clinical Biochemistry*, 40, 219–231.
- Steele, M.W., Breg, W.R., Jr (1966). Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *The Lancet*, 1, 383–385.
- Tabor, A., Madsen, M., Obel, E., Philip, J., Bang, J., Gaard-Pedersen, B. (1986). Randomised Controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *The Lancet*, 327, 1287–1293.
- Tepperberg, J., Pettenati, M.J., Rao, P.N., Lese, C.M., Rita, D., Wyandt, H., Gersen, S., White, B., Schoonmaker, M.M. (2001). Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenatal Diagnosis*, 21, 293–301.
- Tongsong, T., Wanapirak, C., Kunavikantikul, C., Sirirhotiyakul, S., Piyamongkol, W., Chanprapaph, P. (2000). Cordocentesis at 16–24 weeks of gestation: experience of 1320 cases. *Prenatal Diagnosis*, 20, 224–228.
- Tul, N., Spencer, K., Noble, P., Chan, C., Nicolaides, K. (1999). Screening for trisomy 18 by fetal nuchal translucency and maternal serum free β -hCG and PAPP-A at 10–14 weeks of gestation. *Prenatal Diagnosis*, 19, 1035–1042.
- Wald, N.J., Cuckle, H.S., Densem, J.W., Nanchahal, K., Royston, P., Chard, T., Haddow, J.E., Knight, G.J., Palomaki, G.E., Canick, J.A. (1988). Maternal serum screening for Down’s syndrome in early pregnancy. *BMJ: British Medical Journal*, 297, 883–887.
- Wald, N.J., Kennard, A., Densem, J.W., Cuckle, H.S., Chard, T., Butler, L. (1992). Antenatal maternal serum screening for Down’s syndrome: results of a demonstration project. *BMJ: British Medical Journal*, 305, 391–394.
- Wald, N.J., George, L., Smith, D., Densem, J.W., Pettersonm, K., and Group, on behalf of the I.P.S.R. (1996). Serum screening for Down’s syndrome between 8 and 14 weeks of pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 103, 407–412.

Wald, N.J., Rodeck, C., Hackshaw, A.K., Walters, J., Chitty, L., Mackinson, A.M. (2003a). First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS). *Journal Of Medical Screening*, 10, 56–104.

Wald, N.J., Huttly, W.J., Hackshaw, A.K. (2003b). Antenatal screening for Down's syndrome with the quadruple test. *The Lancet*, 361, 835–836.

Weremowicz, S., Sandstrom, D.J., Morton, C.C., Niedzwiecki, C.A., Sandstrom, M.M., Bieber, F.R. (2001). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for rapid detection of aneuploidy: experience in 911 prenatal cases. *Prenatal Diagnosis*, 21, 262–269.

Whitlow, B.J., Economides, D.L. (1998). The optimal gestational age to examine fetal anatomy and measure nuchal translucency in the first trimester. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 11, 258–261.

Wright, D., Bradbury, I., Benn, P., Cuckle, H., Ritchie, K. (2004). Contingent screening for Down syndrome is an efficient alternative to non-disclosure sequential screening. *Prenatal Diagnosis*, 24, 762–766.

Wright, D., Kagan, K.O., Molina, F.S., Gazzoni, A., Nicolaides, K.H. (2008). A mixture model of nuchal translucency thickness in screening for chromosomal defects. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 31, 376–383.

Wright, D., Spencer, K., Kagan K, K., Tørring, N., Petersen, O.B., Christou, A., Kallikas, J., Nicolaides, K.H. (2010). First-trimester combined screening for trisomy 21 at 7–14 weeks' gestation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 36, 404–411.

Van Zalen-Sprock, R.M., Van Vugt, J.M.G., Van Geijn, H.P. (1997). First-trimester sonography of physiological midgut herniation and early diagnosis of omphalocele. *Prenatal Diagnosis*, 17, 511–518.

Internetové zdroje

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze: Doporučení. [online]. [cit. 2013-08-20]. Dostupné z: <http://ukb.lf1.cuni.cz/~dbezd/Doporuceni.htm>

Abbott Molecular: AneuVysion. [online]. [cit. 2013-08-20]. Dostupné z: <http://www.abbottmolecular.com/us/products/genetics/fish/prenatal-genetics-testing-aneuvysion.html>