

Poradnictwo genetyczne: aspekty medyczne, etyczne i prawne diagnostyki prenatalnej.

EWA OBERSZTYN

Zakład Genetyki Medycznej Instytut Matki i Dziecka

Kurs: Badania genetyczne w diagnostyce prenatalnej

Warszawa, 26.06.2020

Badania prenatalne

wszystkie badania wykorzystywane w celu oceny rozwoju zarodka i płodu
na różnych etapach jego rozwoju

Diagnostyka prenatalna

rozpoznawanie chorób płodu we wczesnym okresie ciąży
z zastosowaniem różnych technik badawczych

nieinwazyjna: badania obrazowe (usg, MRI, dopler), biochemiczne markery w surowicy krwi matki, badania skriningowe I/II trymestru, badanie cffDNA (NIPT)

inwazyjna: badania diagnostyczne

- Biopsja trofoblastu (10 -13 tydz. ciąży)
- Amniopunkcja (15 -18 tydz. ciąży lub później w zależności od wskazań)
- Kordocenteza (~20 tyg. ciąży)

Diagnostyka prenatalna

Proces interdyscyplinarny - wieloetapowy a nie procedura diagnostyczna

położnik – ginekolog

perinatolog

radiolog/usg

psycholog

lekarze różnych specjalności medycznych

biolodzy (specjaliści w zakresie genetycznej

diagnostyki laboratoryjnej :

cytogenetyczno-molekularnej

**genetyk
kliniczny**

Aspekty diagnostyki prenatalnej:

- medyczne / poradnictwo genetyczne
- moralno /etyczne
- psychologiczne
- prawne
- socjalno / ekonomiczne

Cele diagnostyki prenatalnej

- wykrywanie chorób, wad wrodzonych, w tym letalnych skutkujących wewnątrzmacicznym obumarciem ciąży lub zgonu w okresie okołoporodowym
- monitorowanie rozwoju płodu, prognozowanie dalszego przebiegu ciąży i sposobu porodu
- ocena stanu płodu w celu wyboru optymalnego momentu i sposobu rozwiązania ciąży
- w przypadku stwierdzenia patologii u płodu podejmowanie decyzji o dalszych losach ciąży (możliwość terapii wewnątrzmacicznej lub terapii po urodzeniu)
- wykrywanie nieprawidłowości u płodu, które mogą mieć wpływ na plany prokreacyjne rodziny i krewnych
- w ciążach podwyższonego ryzyka genetycznego określonej choroby/wady uspokojenie rodziców, że dana wada rozwojowa lub choroba u dziecka nie występuje

Cele diagnostyki prenatalnej

W przypadku uzyskania nieprawidłowych wyników diagnostyki prenatalnej

pomoc rodzicom w uzyskaniu informacji o stanie zdrowia
ich nienarodzonego dziecka, skutkach klinicznych stwierdzonej patologii
oraz
podjęciu autonomicznych decyzji
zgodnych z ich własnym oraz ich rodziny systemem wartości

Diagnostyka prenatalna – kategorie problemów

1. Kobiety ciężarne i / lub partnerzy z obciążonym wywiadem rodzinnym – zidentyfikowane rodziny ryzyka genetycznego przed planowaniem ciąży.
2. Kobiety ciężarne i / lub partnerzy, u których w trakcie trwania ciąży zidentyfikowano ryzyko choroby genetycznej na podstawie wywiadu rodzinnego lub przeprowadzonych badań prenatalnych.
3. Kobiety ciężarne, u których w badaniu usg. zidentyfikowano obecność wad u płodu, a wyniki dotychczas wykonanych badań diagnostycznych jest prawidłowy



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Stałe spektrum pytań

- ✓ Dlaczego wada / choroba wystąpiła ?
- ✓ Czy można było to przewidzieć / zapobiec ?
- ✓ Czy można wyleczyć tę wadę/chorobę ?



Jeśli to choroba genetyczna to

co to oznacza dla mnie i mojej rodziny ?

- ✓ Czy może się powtórzyć u kolejnego dziecka / u krewnych ?
- ✓ Czy można wykonać badania genetyczne, kiedy ?
- ✓ Czy można rozpoznać chorobę w ciąży ? po urodzeniu ?
- ✓ Jakie badania trzeba i można wykonać

Czy wszystko da się wyjaśnić ?

Rodzaje predyspozycji genetycznej w patologii u człowieka

Aberracje chromosomowe

Liczbowe: aneuploidie, poliploidie

Strukturalne: *de novo* / rodzinne (zrównoważone / niezrównoważone
w tym: translokacje, inwersje, izochromosomy,
chromosomy markerowe, delecje/duplikacje

Choroby monogenowe

autosomalne dominujące (AD)

autosomalne recesywne (AR)

sprzężone z chromosomem X

dominujące XL / recesywne (XR)

Znanych ponad 7000 chorób monogenowych

Choroby dziedziczone nie-mendlowsko

mitochondrialne

wieloczynnikowe

zaburzenia epigenetyczne („genomic imprinting”)

Wiele spośród wad to..... choroby letalne.....

w okresie: zarodkowym / płodowym / noworodkowym

10 - 15% poronień samoistnych w I trymestrze ciąży

~ 50% martwych urodzeń /zgonów noworodków

wady wrodzone 20 – 25%

izolowane: 3 - 5%, mnogie: 0,7%

mnogie: związane z określonym zespołem (10%)

✓ **choroby z uogólnionym obrzękiem płodu**

dysplazje szkieletowe

wrodzone choroby metaboliczne

- ✓ **aberracje chromosomowe** (np. triploidia, trisomia 18, trisomia 13, trisomia 22)
- ✓ **zespoły mnogich wad wrodzonych monogenowe** (np. z. Meckela, z. SLO)
- ✓ **izolowane wady wrodzone / sekwencje wad** (np. agenezja nerek, bezmózgowie, rozległe przepukliny mózgowe, oponowo rdzeniowe, cyklopia).

Wiele spośród wad to..... choroby letalne..... dziecku nie można pomóc...

w okresie: zarodkowym / płodowym /noworodkowym

Myślenie genetyczne.....

przed ciążą



**Poradnictwo
genetyczne**

w trakcie ciąży

dokumentacja usg, MRI, badania genetyczne

po porodzie



**bezwzględne wskazanie do zapewnienia rodzinie
porady genetycznej !**

dokładny opis stwierdzonych nieprawidłowości
zdjęcia fotograficzne
zdjęcia radiologiczne
badanie autopsyjne/badania mikroskopowe
zabezpieczenie materiału do badań
izolacja DNA z krwi lub innych tkanek
próbka krwi / krew na bibułę
wycinek skóry / hodowla fibroblastów/ wycinek mięśnia
próbki moczu / płyn mózgowo-rdzeniowy

Testy genetyczne w diagnostyce prenatalnej

Analiza na poziomie chromosomowym:

cytogenetyka klasyczna

- ✓ karyotyp – metody rutynowe (prążkowe GTG, HRT)

cytogenetyka molekularna:

- ✓ FISH (Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ)- metafazowy, interfazowy
- ✓ MLPA i modyfikacje, HR-CGH, QF-PCR
- ✓ porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (aCGH)

Analiza na poziomie DNA / RNA

- ✓ analiza mutacji punktowych (PCR, **Sekwencjonowanie Następnej Generacji NGS**)
- ✓ Sekwencjonowanie DNA met. Sangera
- ✓ analiza dziedziczenia markerów (np. mikrosatelitów)
- ✓ analiza ekspansji powtórzeń nukleotydowych (met. Southerna)
- ✓ analiza metylacji: MS-MLPA

Testy biochemiczne – analiza produktu genu)

- ✓ analiza aktywności enzymów, metabolitów, białek

Diagnostyka prenatalna - proces wieloetapowy

ROLA GENETYKA KLINICZNEGO

- ✓ Podjęcie próby ustalenia przyczyny patologii u płodu
- ✓ Określenie metod diagnostyki płodu (wskazanych /możliwych / rekomendowanych)
- ✓ **omówienie istoty stwierdzonej u płodu patologii, w tym:**
 - omówienie wyników testów genetycznych oraz ryzyka genetycznego**
- ✓ Prognozowanie potencjalnego rozwoju płodu i dziecka po urodzeniu
- ✓ Określenie dalszego postępowania w przebiegu ciąży/ podjęcie decyzji o kontynuacji ciąży
- ✓ Określenie indywidualnego ryzyka wystąpienia patologii u płodu w kolejnej ciąży
- ✓ Ocena czynników ryzyka , które mogą mieć znaczenie dla przyszłych ciąż oraz potomstwa krewnych
- ✓ Wsparcie psychologiczne dla rodziców / follow-up

Standard opieki nad rodzinami ryzyka genetycznego

Porada genetyczna przed i po diagnostyce prenatalnej

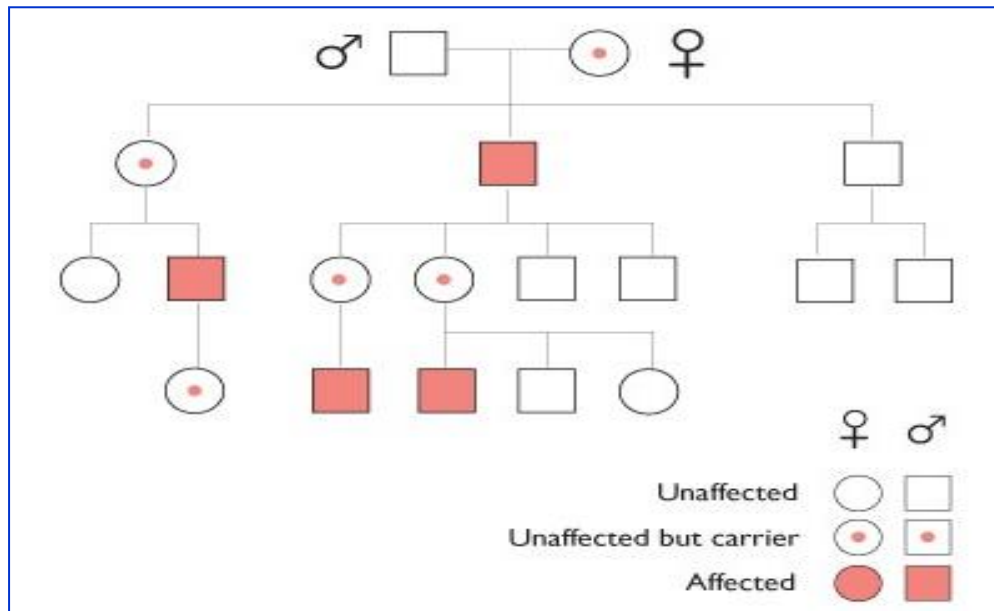
- prawidłowe rozpoznanie choroby na podstawie:
 - oceny cech klinicznych
 - danych wywiadu
 - oceny wyników badań diagnostycznych
- znajomość etiologii choroby
- znajomość sposobu dziedziczenia choroby
- umiejętność oceny ryzyka genetycznego
- znajomość metod profilaktyki pierwotnej / wtórnej chorób

Diagnostyka prenatalna – rola wywiadu

Wywiad lekarski

jeden z podstawowych elementów dobrej praktyki lekarskiej

- ✓ dane rodowodowe
- ✓ dane dotyczące stanu zdrowia ciężarnej i krewnych
 - ✓ ocena cech fenotypowych
- ✓ wyniki badań wykonanych w trakcie ciąży
 - ✓ leki, używki, infekcje.....
- ✓ techniki wspomaganego rozrodu....



Analiza rodowodu !

- ocena rozmieszczenia cech genetycznych w rodzinie
- ocena zróżnicowanej ekspresji choroby u różnych członków rodziny
- określenie toku dziedziczenia choroby
- planowanie badań diagnostycznych w rodzinie

Diagnostyka prenatalna – czynniki ryzyka przed ciążą.....

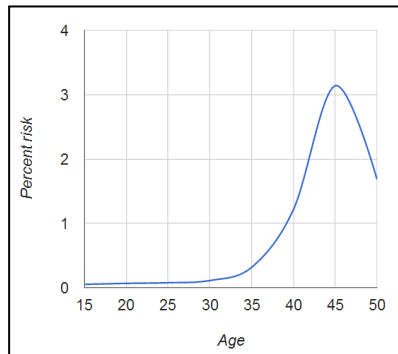
Ad 1.

- ✓ **wiek kobiety > 35 lat**, wiek mężczyzny > 55 lat
- ✓ **zidentyfikowane wcześniej rodziny ryzyka genetycznego**
 - wcześniejsze urodzenie dziecka z aberracją chromosomową / chorobą genetyczną
 - nosiciele zrównoważonych, strukturalnych aberracji chromosomowych
 - jedno z małżonków/partnerów dotknięte chorobą genetyczną (np dystrofia miotoniczna, z Marfana, z. EHD)
 - bezobjawowi nosiciele mutacji genu określonej choroby monogenowej
 - pokrewieństwo małżonków / pochodzenie z określonych grup etnicznych
- ✓ niepowodzenia ciąży (poronienia samoistne, ciążę obumarłe)
- ✓ obciążony wywiad rodzinny (wczesne zgony o nieustalonej etiologii, wady wrodzone / cechy dysmorfii /NI/choroby wrodzone u bliskich krewnych)
- ✓ choroba matki (PKU, padaczka, cukrzyca)
- ✓ metody wspomaganego rozrodu ?? (IVF, diagnostyka preimplantacyjna)

Zaawansowany wiek

kobiety > 35 lat

Wzrost ryzyka



✓ aneuploidii chromosomowych

20 lat 1 / 1,441

30 lat 1 / 959

35 lat 1 / 338

40 lat 1 / 84

45 lat 1 / 32

- wad wrodzonych
- poronienia/ obumarcia ciąży
- niepłodności
- powikłań ciąży
- powikłań okołoporodowych

mężczyźni > 55 lat

Wzrost ryzyka

Zmiany epigenetyczne w spermatocytach

Mutacje *de novo* np. *FGFR3*

- achondroplazja 7,8%

- z. Aperta

Autyzm ?

Schizofrenia ?

Choroba dwubiegunowa ?

Aberracje chromosomowe (47XXY)

Obniżenie płodności

Zaburzenia funkcji jąder/jajników

Zaburzenia stężenia hormonów płciowych

Pogorszenie parametrów nasienia

Zaburzenia fragmentacji DNA w

spermatocytach

Skracenie telomerów

Ryzyko aneuploidii w zależności od wieku

Wiek matki (data porodu)	Ryzyko trisomii 21	Ryzyko innych aberracji
20	1:1480	1:525
25	1:1340	1:475
30	1:940	1:384
35	1:353	1:178
40	1:85	1:62
45	1:35	1:18

Obstet Gynecol 2016; 127(5): e124.

Częstość najczęstszych aneuploidii chromosomowych

Trisomia 21	1 in 700 żywo urodzonych
Trisomia 18	1 in 7500 żywo urodzonych
Trisomia 13	1 in 15 000 żywo urodzonych
Monosomia X (z. Turnera)	1 in 5000 dziewczynek
Trisomia X	1 in 1000 dziewczynek
XXY (z. Klinefeltera)	1 in 1000 chłopców
XYY	1 in 1000 chłopców

Aneuploidia chromosomowa

- stanowi 65 – 85% wszystkich stwierdzanych prenatalnie aberracji chromosomowych
- odpowiedzialna jest za 80 – 95% wad wrodzonych noworodków

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson genetics in medicine. 7th edition. Philadelphia: Saunders/Elsevier;2007.

Wady rozwojowe - marker aberracji chromosomowych

więcej wad – ryzyko większe

Liczba wad	ryzyko aberracji chromosomowej
2 wady	ok. 10%
3 wady	~30%
4 wady	~50%
5 - 7 wad	60-70%
> 8 wad	90%

✓ zidentyfikowane wcześniej rodziny ryzyka genetycznego

- nosiciele zrównoważonych, strukturalnych aberracji chromosomowych

translokacje wzajemne, robertsonowskie, inwersje

- Bezobjawowi nosiciele mutacji genowych zwiększających ryzyko choroby monogenowej

w wywiadzie często

✓ niepowodzenia ciąży (poronienia samoistne, ciążę obumarłe)

✓ obciążony wywiad rodzinny (wczesne zgony o nieustalonej etiologii, NI / wady wrodzone

Częstość aberracji chromosomowych w różnych grupach klinicznych

- | | |
|---|---------|
| • u żywo urodzonych | 0,6% |
| • wady wrodzone i upośledzenie umysłowe | 23,0% |
| • wrodzone wady serca | 13,0% |
| • martwe urodzenia i śmierć okołoporodowa | 6,0% |
| • poronienia samoistne w I trymestrze ciąży | ~ 60,0% |

O czym powinna być poinformowana kobieta ciężarna /partner na temat metod diagnostyki prenatalnej

- ✓ Jakie choroby możliwe są do zbadania poprzez różne metody badań
- ✓ Jakie są metody badań skriningowych w ciąży i w jakim czasie
- ✓ Jakie jest prawdopodobieństwo wykrycia choroby (czułość/swoistość)
- ✓ Jakie jest ryzyko powikłań związanych z badaniem
- ✓ Co oznacza wynik pozytywny / wynik negatywny testu
- ✓ Co oznacza wynik fałszywie pozytywny, a co fałszywie negatywny
- ✓ Jakie są dalsze możliwości postępowania gdy :
 - wynik testu skriningowego jest pozytywny
 - wynik testu diagnostycznego wskazuje na obecność choroby płodu
- ✓ Jakie ma to implikacje kolejnych ciąż i dla krewnych

Diagnostyka prenatalna jako proces a nie procedura laboratoryjna

Nie ma jednej najlepszej opcji postępowania w ciąży !

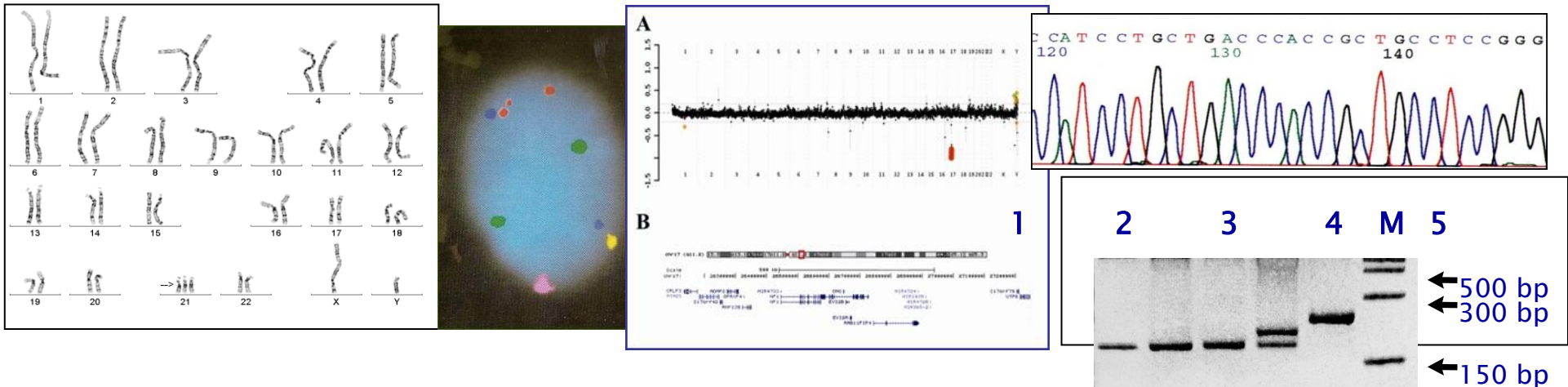
Test skriningowy

Czułość, swoistość, wiarygodność (dokładność)
tzw. „gold”-standard

Test diagnostyczny

wartość predykcyjna dodatnia (PPV)/wartość predykcyjna ujemna (NPV)
w teście diagnostycznym ~ 100%

- Jakie genetyczne testy są możliwe do wykonania ?
- Jaki genetyczne testy powinny być oferowane ?
- Jakie genetyczne testy powinny być rekomendowane ?



Diagnostyka prenatalna - metody nieinwazyjne

✓ wizualizacja płodu – markery aneuploidii / anatomia płodu

USG: 11-14tyg.; 18-22 tyg.; 30-32 tyg.; (ocena CRL, FHR, markery: NT, kość nosowa, fala wsteczna w przewodzie żylnym, przepływ w z. trójdzielnej (TR), opóźnienie wzrastania (EGR) i inne.....

ECHO: <14 tyg. przy CRL >60mm; najczęściej (20 -24 tyg.)

MRI: zwykle III trymestr

Przesiewowe badania prenatalne – wykrycie kobiet ciężarnych z grupy ryzyka genetycznego
badanie markerów biochemicznych (I i II trymestr) – substancje pochodzenia płodowego

przenikające do krwioobiegu matki: **białko Papp-A:** syntetyzowane w trofoblaście,
β-hCG: hormon produkowany przez trofoblast; **AFP :** płodowa wątroba / zarodkowy pęcherzyk żółtkowy; **wolny estriol (uE3)** – łożysko i gonady; **inhibina A** (łożysko i gonady)

(skrining aneuploidii T21, T18, T13)

Ryzyko aneuploidii wynikające z wieku → ryzyko skorygowane dla T21, T18, T13

„cutoff” : ryzyko 1/300 (diagn. Inwazyjna)

Badanie cffDNA (>10tyg. ciąży) (Non Invasive Prenatal Test) – aneuploidie, konflikt RH



w praktyce NT nie powinno przekraczać 2,5 mm.

NT jest wprost proporcjonalne do ryzyka wystąpienia trisomii u płodu:

NT - 3mm	- 3 krotny wzrost w stosunku do wieku matki
NT - 4mm	~ 20%
NT - 5mm	~ 33%
NT - 6mm	~ 50%
NT ≥ 6,5mm	~ 65%

ale

NT > 3,5mm u płodów z prawidłowym kariotypem

wady serca

wady OUN

wady układu szkieletowego

wady ściany brzucha

cystic hygroma / obrzęk uogólniony

choroby monogenowe

Badania ECHO w każdym przypadku podwyższonej NT !

Porównanie wykrywalności (DR) przy odsetku wyników fałszywie dodatnich 5%, dla różnych metod skryningu w kierunku trisomii 21.

Wiek ciężarnej	30
Wiek i markery biochemiczne w surowicy między 15., a 18. t. c.	50 - 70
Wiek i NT między 11.(+0)-13.(+6) t. c.	70 - 80
Wiek, NT, wolna podjednostka β -hCG i PAPP-A między 11.(+0)-13.(+6) t. c.	85 - 90
Wiek, NT, kość nosowa między 11.(+0)-13.(+6) t. c	90
Wiek, NT, kość nosowa, wolna podjednostka β-hCG i PAPP-A między 11.(+0)-13.(+6) t. c.	95

Skrining aneuploidii (T21, T18, T13) – metody

Typ testu	Wiek ciąży (tyg.)	Wskaźnik detekcji dla trisomii 21	Wynik fałszywie pozytywny (%)	Oceniane parametry
test I trymestru	10 – 14	82–87	5	NT, Papp-A β hCG,
Test potrójny	14 – 20	69	5	β hCG, AFP uE3
Test poczwórny	15 – 22	81	5	β hCG, AFP uE3, DIA
Test zintegrowany	10 – 14 i 15 – 20	96	5	Parametry I trym. + test poczwórny
Wolne płodowe DNA (cffDNA)	> 10 tyg.	99	0,5	Analiza molekularna DNA z płodowego DNA z surowicy matki

Test przesiewowy ! o wysokim DR (wskaźnik detekcji)

**Kiedy rozważać badanie cell free fetal DNA (cffDNA)
(NIPT Non Invasive Prenatal Test) – technika NGS
najpierw konsultacja genetyczna !!**

- Ryzyko pośrednie aneuploidii w teście złożonym
1:100 – 1:1000
- Brak wyniku badania przesiewowego I trymestru u kobiet z grupy podwyższonego ryzyka (wiek), kiedy USG płodu jest prawidłowe
- Wiek ≥ 35 lat ?
- Trisomia 21 /13 lub 18 w poprzedniej ciąży
- Nosicielstwo translokacji zrównoważonej u jednego z małżonków zwiększające ryzyko trisomii 21 lub 13
- Brak akceptacji diagnostyki inwazyjnej (np. ciążę po IVF)

Kiedy nie wykonywać badania cffDNA

- ✓ Ryzyko aneuploidii w teście złożonym $> 1:100$
- ✓ Mnogie wady strukturalne w badaniu USG płodu
- ✓ Ciążę mnogie (>2) / ciąża bliźniacza z obumarciem jednego płodu
- ✓ Równolegle z biopsją trofoblastu / amniopunkcją

Konsultacja przed wykonaniem NIPT i po wyniku !

Ograniczenia NIPT

- ✓ Nie identyfikuje: (nie rozróżnia specyficznych form aneuploidii (z. Downa w wyniku robertsonowskiej translokacji).
- ✓ Nie identyfikuje mutacji genowych
- Wynik nieinformacyjny (wiek ciąży < 10 tyg.; wysokie BMI)
- Możliwość fałszywie dodatniego wyniku (CMF, vanishing twin)
- **Potwierdzenie wyniku NIPT konieczne !**

Diagnostyka prenatalna inwazyjna

Wskazania do badań diagnostycznych

- **Ryzyko aneuploidii chromosomowej $\geq 1 : 300$**
- **Wysokie ryzyko określonej choroby monogenowej – znany defekt molekularny**

I trymestr ciąży – badania diagnostyczne

10 -14 tydz. biopsja kosmówki

- diagnostyka aberracji chromosomowych (kariotyp rutynowy, aCGH, FISH, MLPA, QF-PCR)
- diagnostyka chorób monogenowych (mutacje punktowe, mutacje dynamiczne – różne techniki diagnostyczne (sekwencjonowanie DNA, MLPA, PCR, NGS))

II trymestr ciąży - badania diagnostyczne (płyn owodniowy, krew płodowa, mocz ciężarnej)

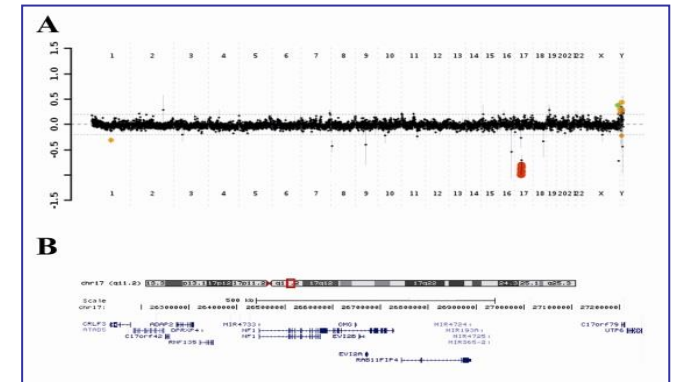
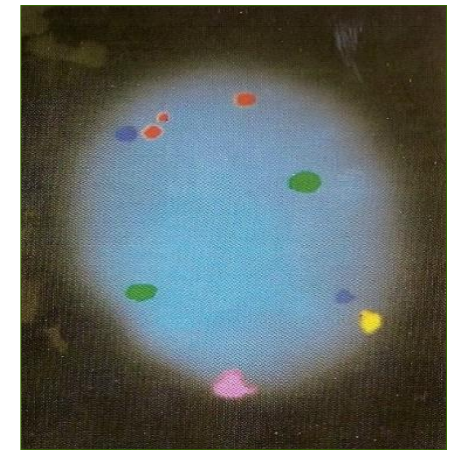
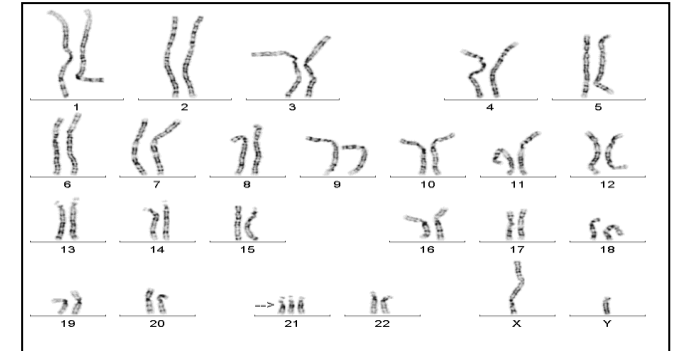
15-22 tydz. amniopunkcja / kordocenteza (kariotyp rutynowy, aCGH i /lub

sekwencjonowanie DNA, inne techniki celowane na określony defekt molekularny

- stężenie AFP
- badania biochemiczne w moczu ciężarnej (z SLO), enzymatyczne, markery infekcji wewnątrzmacicznej

Prenatalna diagnostyka cytogenetyczna

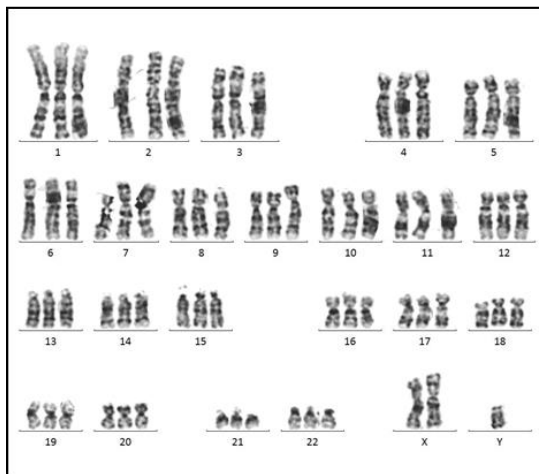
- Ocena kariotypu płodu metodami cytogenetyki klasycznej (analiza obrazu prążkowego chromosomów) **detekcja 2-5%**
- Szybka diagnostyka aneuploidii chromosomów 13, 18, 21, X i Y
- Kariotyp molekularny (analiza genomu płodu metodą CGH do mikromacierzy) **18-30%**



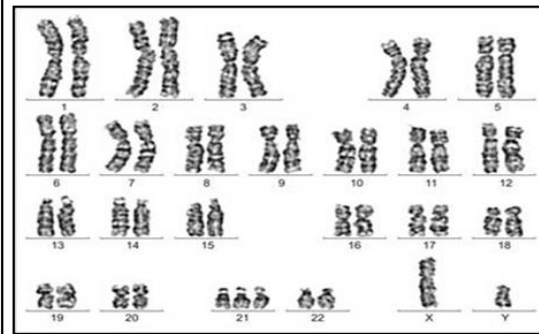
Ad 2. Kobiety ciężarne / lub partnerzy, u których w trakcie trwania ciąży zidentyfikowano ryzyko choroby genetycznej

- ✓ wynik badań przesiewowych I lub II trymestru ciąży wskazujący na zwiększone ryzyko aberracji chromosomowej (test Pappa, NIPT, USG)
- ✓ nieprawidłowy wynik diagnostyki inwazyjnej (aberracja chromosomowa, potwierdzenie choroby monogenowej)
- wady strukturalne u płodu w badaniu USG/ MRI
- dysharmonia budowy: IUGR, małogłowie, wodogłowie, skrócenie kkg/kkd
- uogólniony obrzęk płodu / wodniaki karku / zaburzenia rytmu serca
- zaburzenia ilości wód płodowych (małowodzie, wielowodzie)

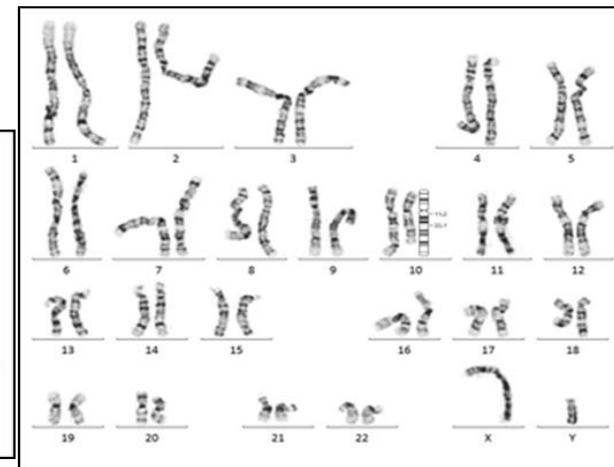
Rutynowy kariotyp (GTG): identyfikacja 3 - 7% przypadków



Triploidia



Trisomia 21



Delecja 10q11.2q22.1

Diagnostyka prenatalna

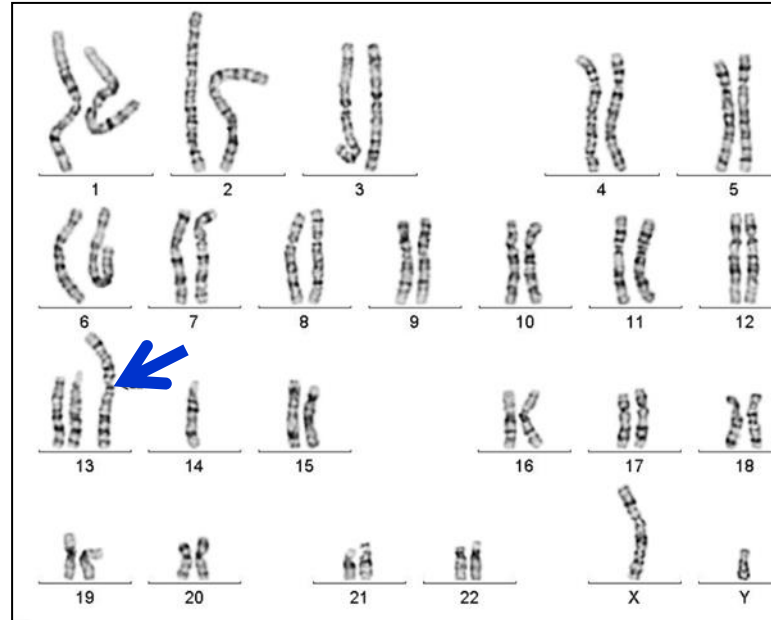
Pacjentka lat 31, ciąża II, w wywiadzie 1x ciąża obumarła

Skrining I trymestr – ryzyko trisomii 13: 1/ 25

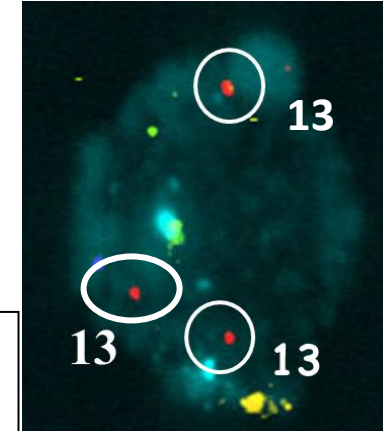
USG w 17 tyg. ciąży: IUGR, małogłowie,
rozszerzenie wargi, wada serca VSD,
podejrzenie polidaktylii
amniopunkcja

**Wynik badania kariotypu
met GTG:**

46,XY,der(13;14)(q10;q10)+13



R- FISH



Kariotypy obojga małżonków !

Kariotyp matki: 45,XX (13;14)(q10q10)

Porada genetyczna !

Pacjentka lat 38 - ciąża I (16 tydz.) po IVF

3 nieudane próby IVF

Test PAPP-A: ryzyko trisomii 21 u płodu - 1:114

PORADA GENETYCZNA !

Dylemat - jaką metodę diagnostyczną wybrać ?

amniopunkcja : kariotyp rutynowy - wynik za 14 dni

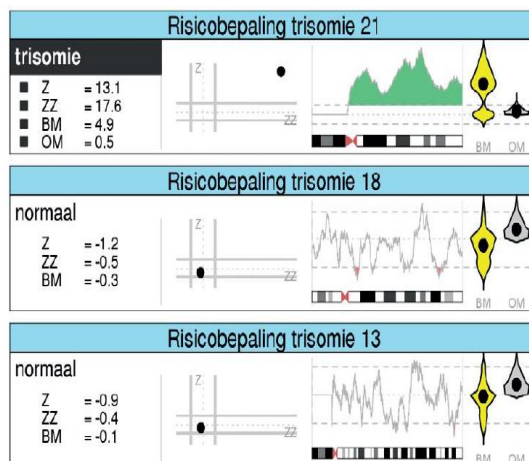
FISH interfazowy - wynik za 48 godz.

aCGH - wynik za 3-7 dni

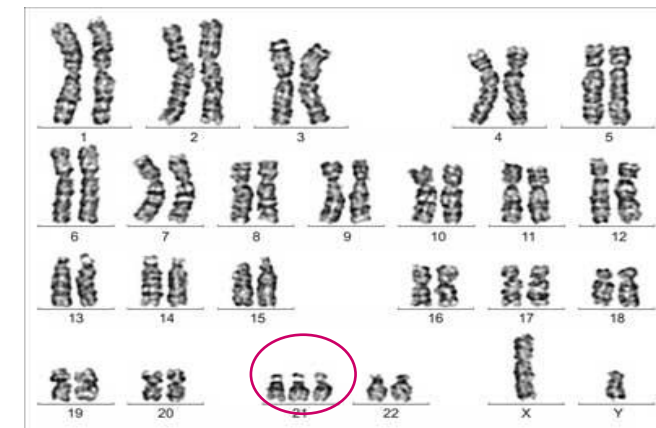
NIPT (cffDNA) we krwi kobiety wynik za 7 - 14 dni)

Wynik NIPT: ↑↑ ryzyko trisomii 21

konieczność weryfikacji z komórek
płodu pobranych metodą inwazyjną



Kariotyp z płynu owodniowego



Prognozowanie ryzyka genetycznego w kolejnej ciąży

Tylko wynik kariotypu rozstrzyga o wielkości ryzyka genetycznego

z. Downa

95% trisomia prosta chr. 21
1% mozaika chromosomowa
4% translokacja niezrównoważona
*„de novo” lub jedno z rodziców jest
nosicielem translokacji zrównoważonej*

zmiana	Nosiciel (rodzic)	Ryzyko %
Translokacja 13; 14	Którykolwiek	1
Translokacja 14; 21	ojciec	1
Translokacja 14; 21	matka	15
Translokacja 21; 22	ojciec	5
Translokacja 21; 22	matka	10 -15
Translokacja 21; 21	którykolwiek	100
Translokacja wzajemna (każda)	którykolwiek	12 -15
Insercja (każda)	którykolwiek	50

aCGH w diagnostyce prenatalnej

wykrywanie submikroskopowych aberracji chromosomowych (mikrodelecje/mikroduplikacje)

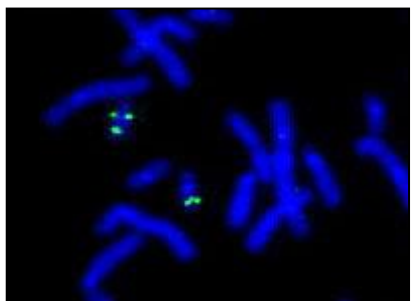
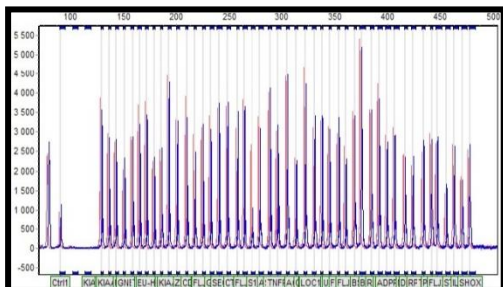
Pacjentka lat 26, ciąża I
USG 12 tyg+3dni: NT 3.5mm

USG płodu w 20 tyg. : wada serca (TOF)
wodonercze jednej nerki

Kariotyp rutynowy: 46,XX

Wynik: znany zespół mikrodelecji

MLPA



Met FISH

aCGH
del 22q11,2
~ 2,7 Mbp

Zmiana patogenna

MLPA / FISH u rodziców

✓ „de novo”
✓ obecna u jednego
z rodziców ?

genotyp-fenotyp

Czy stwierdzona zmiana
odpowiada patologii u płodu ?

Poród w ośrodku referencyjnym

Badanie krewnych

Porada genetyczna

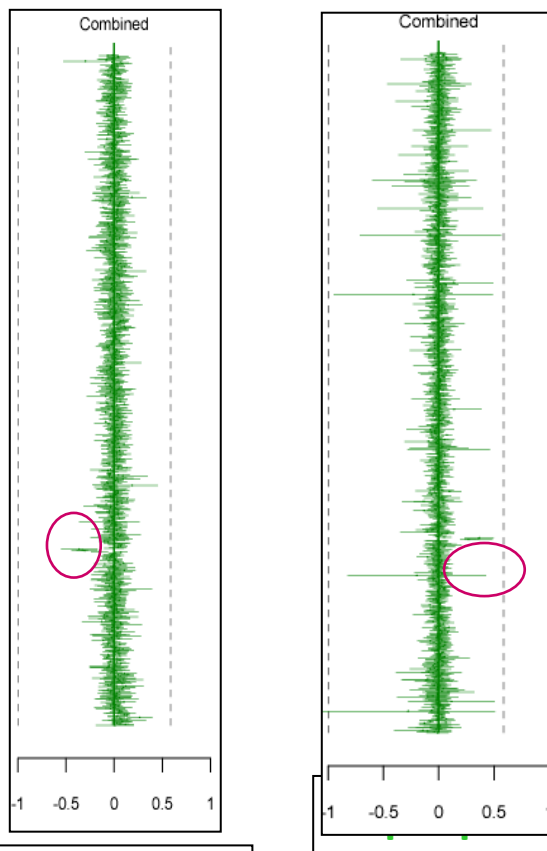
Konsultacja genetyczna po urodzeniu

Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (aCGH)

detekcja zmian (1MPz – 1 pz)

Zmiana liczby kopii sekwencji DNA (CNVs)

„Kariotyp molekularny”



del 17q23

możliwość identyfikacji submikroskopowych aberracji w całym genomie !

- ✓ bez uprzedniej wiedzy o ich istnieniu
- ✓ podczas jednego badania.
- ✓ duża liczba pacjentów w krótkim czasie
- ✓ nie wymaga hodowli komórkowej
- ✓ **wynik w ciągu 24 - 48 godzin !**

Obecnie w IMiD stosowana jako pierwsza w wyborze

- ❑ W prenatalnej diagnostyce w przypadkach mnogich wad strukturalnych u płodu

mnogie wady wrodzone: 9 -17% (śr 6,8%)

NT $\geq 3,5$ mm

1,8-7,1% (śr 4,5%)

IUGR

6,7 – 19%

[Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.](#)

2017 Jul;42:53-63.

[Clin Lab Med.](#) 2016 Jun;36(2):261-76

W poszukiwaniu przyczyny patologii u płodu.....

Usg I trymestr

- NT 2,8mm

Usg 21 tygodni

- Cechy hipotrofii płodu, VSD ?
- Stopa końsko - szpotawa
- Jednostronny rozszczep wargi

Wywiad położniczy

- 4 x poronienie samoistne
- 1 x martwe urodzenie 41 tyg.
- cukrzyca ciążowa u matki
- 4 dzieci zdrowych
- rodzice kariotypy prawidłowe

Brak korelacji fenotypu
z % mozaiki

rokowanie ?

opieka hospicjum

1 doba życia



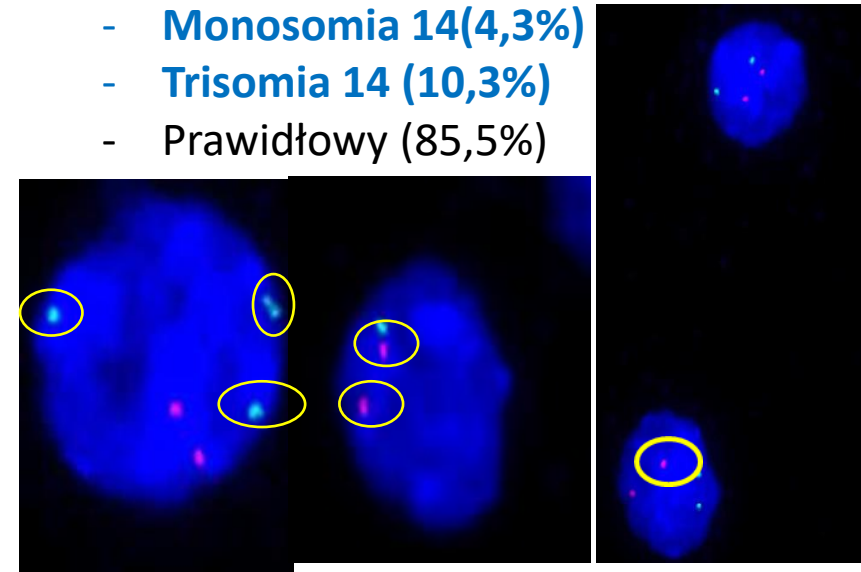
Rozszczep podniebienia
Dysmorfia

Kariotyp rutynowy po urodzeniu:

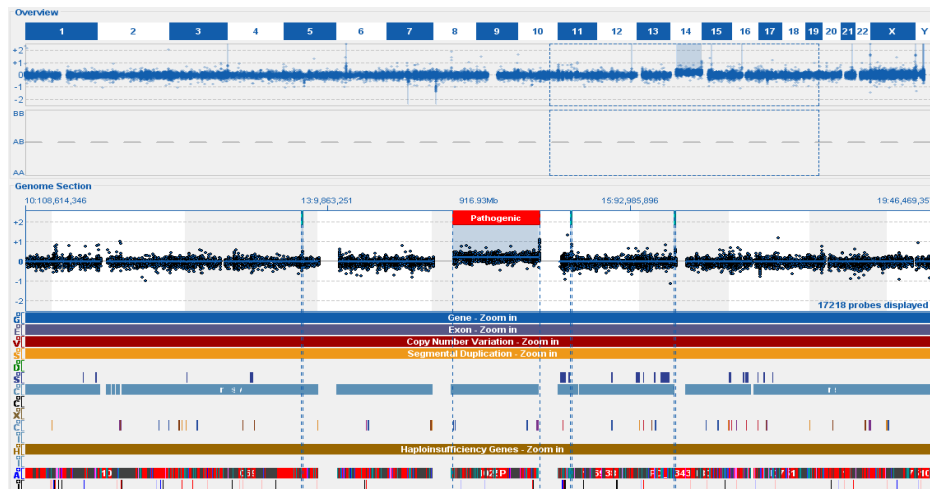
Mos 47,XY,+14[2]/46,XY[53] (mos 3,6%)

FISH interfazowy po urodzeniu

- Monosomia 14(4,3%)
- Trisomia 14 (10,3%)
- Prawidłowy (85,5%)



Mozaika (8%) trisomia chromosomu 14 *de novo*



aCGH w diagnostyce prenatalnej

Pacjentka lat 36, ciąża II, skrining I trymestru (PAPP-a) – podwyższone ryzyko aneuploidii : T21 - 1: 87; **NT 4,9mm**

USG płodu w 18 tyg. prawidłowe

Wynik aCGH płodu: arr [GRCh37] 3p26.3p26.2(2309130- 2819142)x3
~ 510 kpz.

Duplikacja obejmuje eksony 3-6 genu *CNTN4* (OMIM: 607280)

duplikacja *CNTN4*: pojedyncze przypadki w piśmiennictwie
uogólniona / ogniskowa padaczka,
spektrum autyzmu, ch. psychiczne

genotyp-fenotyp ?

zmiana patogenna ??

odziedziczona od zdrowego ojca - niepełna penetracja zmiany ?

bardzo trudna porada genetyczna

Konsultacja genetyczna po urodzeniu / follow up

Ad 3. Kobiety ciężarne, u których w badaniu usg. zidentyfikowano obecność wad u płodu z prawidłowym kariotypem (GTG ; aCGH)

- Izolowane wady wrodzone dziedziczone wieloczynnikowo (np. WCN, wady serca, rozszczep wargi i /lub podniebienia,

Wady cewy nerwowej (WCN) - profilaktyka pierwotna (kwas foliowy)

- ✓ 70% wady izolowane (AFP w płynie owodniowym)
- ✓ 2,4 – 16,3% w zespołach aberracji chromosomowych
 - ✓ zespoły / sekwencje malformacyjne z WCN

zespół błon amniotycznych, extrofia kloaki, wady przedniej ściany brzucha (omphalocele, wytrzewienie), OEIS, zarośnięcie odbytu, zespół regresji kaudalnej

zespoły monogenowe z WCN

zespół Waardenburga, zespół Currarino , zespół Meckela

- **Mnogie wady związane z zespołem genetycznym (w tym zespoły dysmorficzne) uwarunkowanym monogenowo**

Pacjentka lat 38, ciąża I, USG I trymestr : NT- 6mm

Amniopunkcja: kariotyp prawidłowy 46,XY

USG 21 tyg.: IUGR, małogłowie, obustronny rozszczep wargi, wada serca (AVSD) spodiectwo ?- płeć płodu żeńska ?

Diagnostyka różnicowa:

aberracja submikroskopowa ? aCGH ?

zespół Smitha-Lemli – Opitz’a (SLO) ? dziedziczenie AR

Nieinwazyjna diagnostyka biochemiczna w ciąży !

ocena w próbce moczu stosunku

8-dehydroestriolu do estriolu

oraz 7- dehydropregnantriolu do pregnantriolu

Wynik badania wskazuje na rozpoznanie / wykluczenie zespołu

**Sekwencjonowanie genu DHCR7 (11q12-q13) met Sangera
u dziecka / u rodziców**

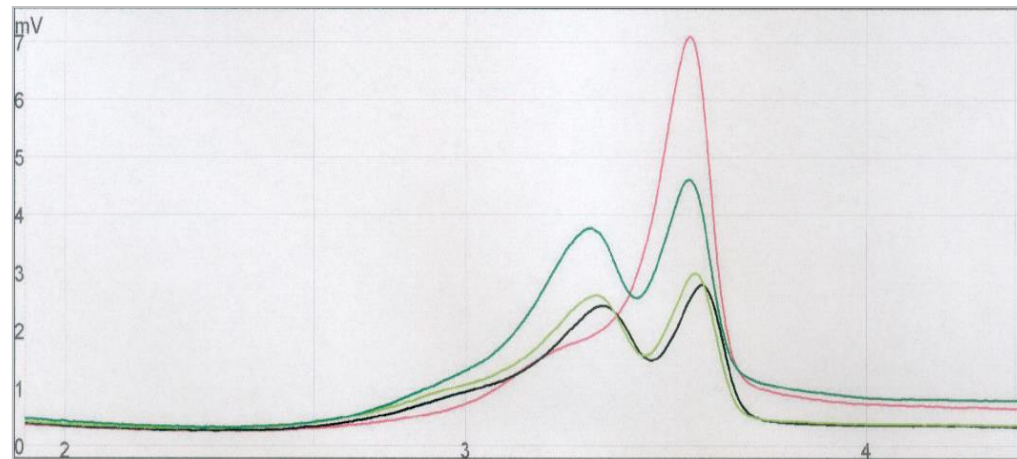
DIAGNOSTYKA PRENATALNA ZESPOŁU CROUZONA

WYNIKI analizy DNA

obecność mutacji

c.799T>C, S267P

w eksonie IIIa genu *FGFR2*



Analiza DHPLC

widoczna zmiana ilościowa w chromatogramie:

2 piki w przypadku próbek zawierających mutację.



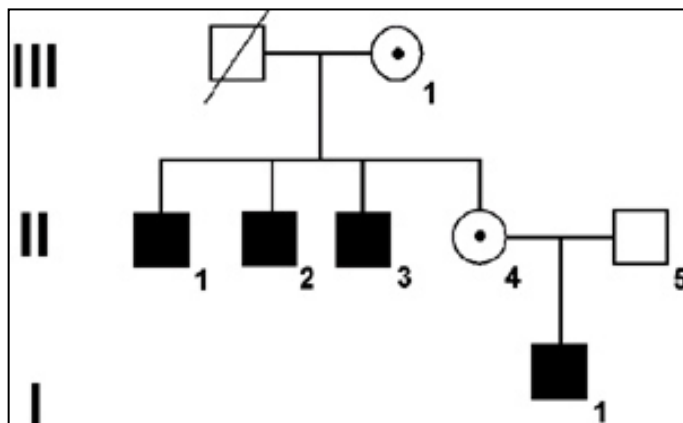
28 Hbd
USG 3D



1 doba życia

Diagnostyka prenatalna

zespół łamliwego chromosomu X (FraX) X - dominujące



NI, spektrum autyzmu , zaburzenia zachowania,
cechy nadpobudliwości , makroorchidyzm

Pacjentka lat 34, ciąża I,

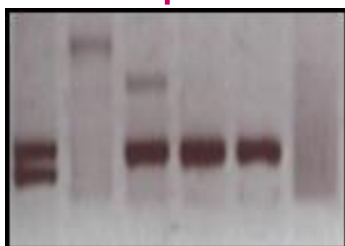
test złożony: ryzyko T21: 1: 157

Nosicielka premutacji genu *FMR1*

ryzyko z. FraX - 1: 2

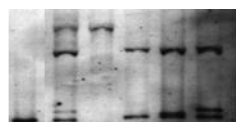
Nosicielki premutacji/mutacji
ważne poradnictwo genetyczne !

PCR – przesiew



-/- p? p?/- -/? - m?

Hybrydyzacja genomowa
techniką Southerna



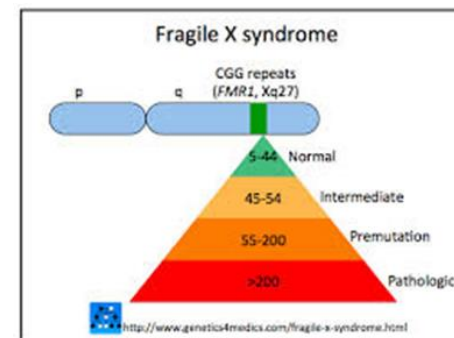
- m/- m -/- -/- p/-

**Mutacja dynamiczna genu *FMR1* – nadmierne
wydłużenie niestabilnej sekwencji powtórzonej (CGG)_n**

- Określenie płci płodu
- Analiza mutacji *FMR1*

płeć męska

płeć żeńska ?



W poszukiwaniu przyczyny wad wrodzonych.....u płodu...

Pacjentka lat 30, nieprawidłowy wynik usg w 24 tyg. ciąży II

- Skrócenie kończyn o ok. 4 tyg.
 - Wąska klatka piersiowa
 - Wada serca HLHS - AVSD
 - Polidaktylia / syndaktylia
- I trymestr ciąży
- NT: 1,8mm
 - Test Pappa: niskie ryzyko tris 21;18;13

Wykluczono z. SLO (badanie biochemiczne moczu pacjentki

Wynik aCGH: dup16q11.2 ~ 846kpz (ojcowskie pochodzenie)

Zmiana o niepewnym znaczeniu

Czy możemy coś jeszcze zrobić ? – pyta pacjentka

Diagnostyka różnicowa (OMIM, LDDb), PubMed

- Dysplazja szkieletowa ?
- **Zespół monogenowy : jaki ? Elis van Crevelda ?**

Ale*Problem heterogenności genetycznej (mutacje wielu genów odpowiedzialne za podobne skutki kliniczne)*

W poszukiwaniu przyczyny wad wrodzonych.....u płodu.....

Sekwencjonowanie następnej generacji (Next Generation Sequencing))

Umożliwia jednoczasową analizę:

- ✓ określonego genu
- ✓ wszystkich eksonów w genomie
- ✓ całego genomu (**Whole Genome Sequencing - WGS**)
- ✓ całego exomu (**Whole Exome Sequencing - WES**)

aCGH - Cytosure Constitutional x3,
8x60k;GRCh37/hg19 **dup16q11.2** ~ 846kpz



WYNIK WES – prenatalny

Nimblegen SeqCap EZ HGSC VCRome 2.1

Projekt badawczy

U płodu: homozygotyczna delecja
dwóch nukleotydów

(chr4:5711413_CG>-, która zmienia
ramkę odczytu w ex 1 genu **EVC**

Oboje rodzice: heterozygoty zmiany

rozpoznanie przyczyny mnogich wad

zespół Elis van Crevelda (OMIM 604831)

dziedziczenie - AR !

Porada genetyczna

W poszukiwaniu przyczyny wad wrodzonych.....

Ciąża I, bliźniacza jednokosmówkowa

Wskazania do diagnostyki prenatalnej :

Nieprawidłowy wynik USG obu płodów w 23 tyg.

- przepuklina mózgowa okolicy potylicznej
- podejrzenie wady serca,
- hexadaktylia palców dłoni i stóp,
- podejrzenie syndaktylii palców

Amniopunkcja

Kariotyp : 46,XY

Wynik badania (aCGH)

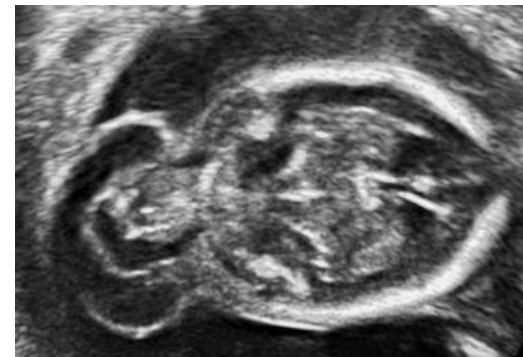
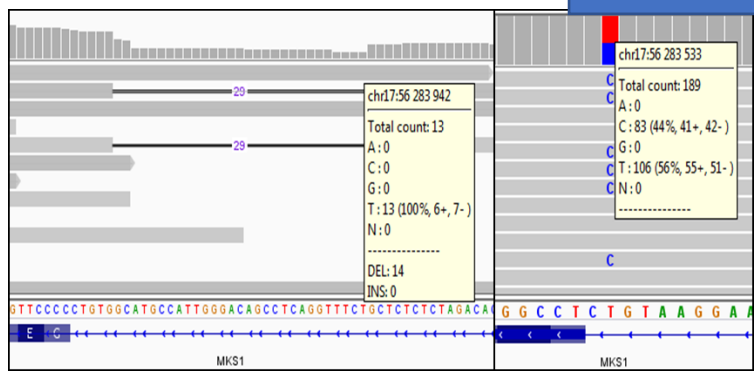
arr (1-22)x2,(XY)x1 - prawidłowy

Stężenie alfa1fetoproteiny

płód I : 23152 IU/ml (norma)

płód II : 22028 IU/ml (norma)

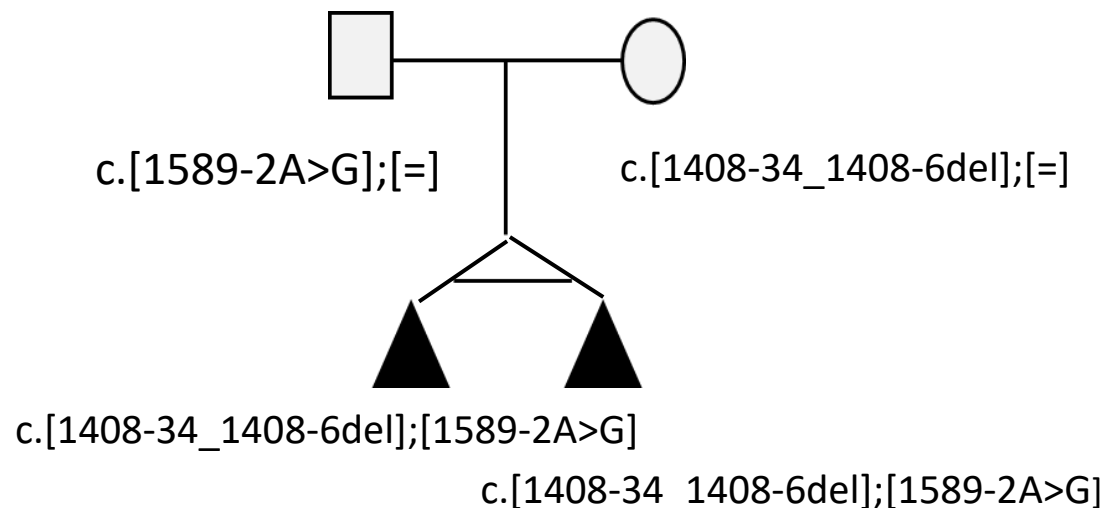
wykluczono zespół SLO



podejrzenie z. Meckela – Grubera
ale !

➤ 10 różnych genów w etiologii zespołu !

➤ możliwe inne zespoły monogenowe



Mutacja homozygotyczna w genie MKS1

W poszukiwaniu przyczyny wad wrodzonych.....w ciąży i po urodzeniu

I trymestr prawidłowy



wielotorbielowatość
nerek u płodu
25 tyg. ciąży
wody płodowe -norma
Wynik aCGH prawidłowy

WYWIAD !!!

rodzice spokrewnieni !

PSN 38 tydz. ciąży; 3200g /55cm
10 pkt wg Apgar, makrocefalia, cechy dysmorfii,
(duże ciemię przednie, dysplastyczne małżowiny)
I doba życia: nagłe pogorszenie stanu ogólnego
kwasica metaboliczna, zaburzenia oddychania
hipoglikemia, **hipotonia**, **specyficzny słodki zapach**
skóry. MRI podejrzenie wady OUN
zgon w II dobie życia

Diagnoza ?

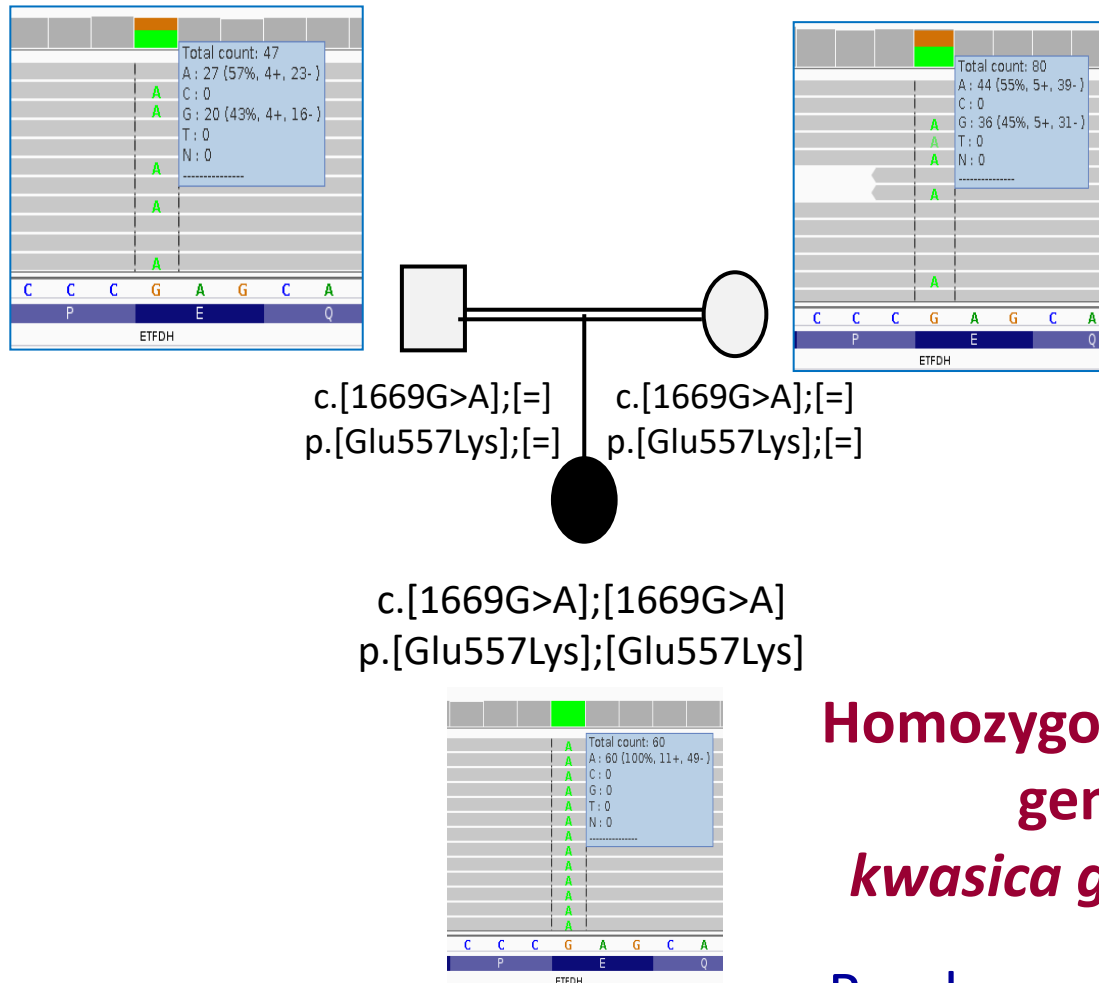
Kwasica metaboliczna, zespół Zellweger,
MADD-S multiple acyl-coa dehydrogenase deficiency

Wynik badania met. TANDEM/MS; GCMS
podejrzenie kwasicy glutarowej typu 2 (AR)

geny: ETFA, ETFB, ETFDH

W poszukiwaniu przyczyny wad wrodzonych.....

Sekwencjonowanie eksomu (WES) Agilent SureSelect Human All Exon v6 na platformie NovaSeq6000 (2x100bp Illumina)



**Homozygotyczna mutacja w
genie *ETFDH*
kwasica glutarowa typu 2**

Ryzyko powtórzenia 25%

PERSPEKTYWY

**Najpoważniejsze wyzwanie
to interpretacja wyniku diagnostycznego !**

fenotyp $\xrightarrow{\text{dawniej}}$ genotyp

genotyp $\xrightarrow{\text{obecnie coraz częściej}}$ fenotyp

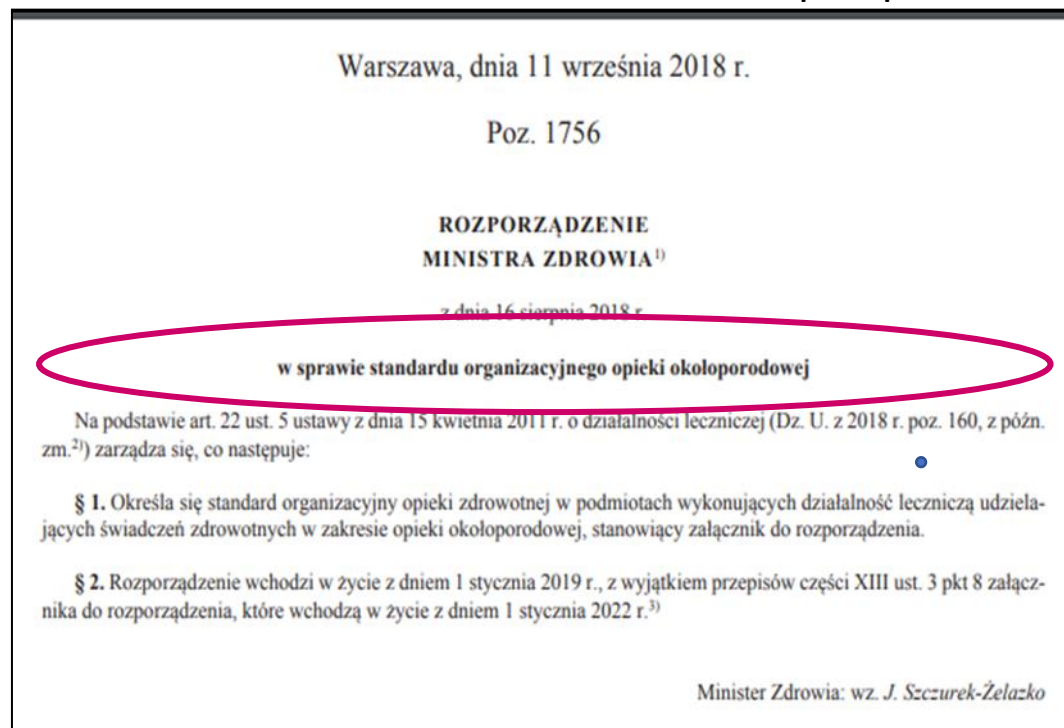
„... Lekarz ma obowiązek zapoznać pacjentów z możliwościami współczesnej genetyki lekarskiej, a także diagnostyki i terapii przedurodzeniowej...”

Kodeks Etyki Lekarskiej, art. 38 p. 3; 2003

Program Badań Prenatalnych finansowany przez Narodowy Fundusz Zdrowia (NFZ).

(zgodnie z **Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 21.12.2004 r.**

rozporządzenie nr 17/2004 Prezesa NFZ w sprawie zakresu świadczeń opieki zdrowotnej, w tym badań przesiewowych oraz okresów, w których te badania są przeprowadzane



Obowiązek lekarza i położnej
„przekazanie informacji
o możliwości wykonania
badań w kierunku chorób
uwarunkowanych genetycznie”



U S T A W A

z dnia 7 stycznia 1993 r.

o planowaniu rodziny, ochronie płodu ludzkiego i warunkach dopuszczalności przerywania ciąży

Uznając, że życie jest fundamentalnym dobrem człowieka, a troska o życie i zdrowie należy do podstawowych obowiązków państwa, społeczeństwa i obywatela; uznając prawo każdego do odpowiedzialnego decydowania o posiadaniu dzieci oraz prawo dostępu do informacji, edukacji, poradnictwa i środków umożliwiających korzystanie z tego prawa, stanowi się, co następuje:

Art. 1. ¹⁾ Prawo do życia podlega ochronie, w tym również w fazie prenatalnej w granicach określonych w ustawie.

Art. 2. 1. Organy administracji rządowej oraz samorządu terytorialnego, w zakresie swoich kompetencji określonych w przepisach szczególnych, są obowiązane do zapewnienia kobietom w ciąży opieki medycznej, socjalnej i prawnej w szczególności poprzez:

- 1) opiekę prenatalną nad płodem oraz opiekę medyczną nad kobietą w ciąży,
- 2) pomoc materialną i opiekę nad kobietami w ciąży, znajdującymi się w trudnych warunkach materialnych, na zasadach określonych w ustawie z dnia 29 listopada 1990 r. o pomocy społecznej (Dz. U. z 1998 r. Nr 64, poz. 414, Nr

Opracowano na podstawie: Dz. U. z 1993 r. Nr 17, poz. 78, z 1995 r. Nr 66, poz. 334, z 1996 r. Nr 139, poz. 646, z 1997 r. Nr 141, poz. 943, Nr 157, poz. 1040, z 1999 r. Nr 5, poz. 32, z 2001 r. Nr 154, poz. 1792.

Aspekty prawne diagnostyki prenatalnej

2a. Organy administracji rządowej oraz samorządu terytorialnego, w zakresie swoich kompetencji określonych w przepisach szczególnych, są zobowiązane zapewnić swobodny dostęp do informacji i badań prenatalnych, szczególnie wtedy, gdy istnieje podwyższone ryzyko bądź podejrzenie wystąpienia wady genetycznej lub rozwojowej płodu albo nieuleczalnej choroby zagrażającej życiu płodu.

Standard opieki nad rodzinami ryzyka genetycznego

Porada genetyczna przed i po diagnostyce prenatalnej

Warunki określające zasadność przeprowadzenia prenatalnych badań genetycznych w rodzinach ryzyka genetycznego

- ✓ Zwiększone w stosunku do populacyjnego ryzyko choroby u potomstwa
 - ✓ Choroba jest nieuleczalna na obecnym etapie wiedzy
 - ✓ Poważne skutki kliniczne: ciężkie kalectwo fizyczne i umysłowe
 - ✓ Istnieją techniczne możliwości (odpowiedni marker diagnostyczny)
- umożliwiający w pełni wiarygodne rozpoznanie lub wykluczenie choroby

✓ **Wyrażenie przez pacjentkę świadomej zgody na badanie prenatalne !**

Porada genetyczna przed i po diagnostyce prenatalnej

Aspekty prawne

Ryzyko powikłań /utruty ciąży

✓ Amniopunkcja	0.5% - 1.0% (0.17 to 1.53%)
✓ Biopsja trofoblastu	0.5% to 1.0%
✓ Kordocenteza	
- bez wad wrodzonych	1.3%
- jedna lub mnogie wady / IUGR	1.3% - 25%

J Obstet Gynaecol Can 2015;37(7):656–668

Diagnostyka prenatalna

- 3% ryzyko urodzenia dziecka z wadą/chorobą genetyczną wymagającą interwencji
- brak 100% gwarancji urodzenia zdrowego dziecka nawet gdy wynik badania prenatalnego jest prawidłowy
- indywidualne podejście do procesu diagnostyki prenatalnej: różnice etnokulturowe, moralne, wyznaniowe
- podstawowa zasada: nie oceniającego, niedyrektywnego poradnictwa genetycznego – pomoc w podjęciu decyzji
- decyzja o terminacji / kontynuacji ciąży po wyniku diagnostyki prenatalnej - *nigdy nie jest łatwa*

Art. 4a. 1. Przerwanie ciąży może być dokonane wyłącznie przez lekarza, w przypadku gdy:

- 1) ciąża stanowi zagrożenie dla życia lub zdrowia kobiety ciężarnej,
- 2) badania prenatalne lub inne przesłanki medyczne wskazują na duże prawdopodobieństwo ciężkiego i nieodwracalnego upośledzenia płodu albo nieuleczalnej choroby zagrażającej jego życiu,
- 3) zachodzi uzasadnione podejrzenie, że ciąża powstała w wyniku czynu zabronionego,
- 4) (utracił moc).²⁾

**Co to jest
choroba letalna ?**

2. W przypadkach określonych w ust. 1 pkt 2 przerwanie ciąży jest dopuszczalne do chwili osiągnięcia przez płód zdolności do samodzielnego życia poza organizmem kobiety ciężarnej; w przypadku określonym w ust. 1 pkt 3 lub 4, jeżeli od początku ciąży nie upłynęło więcej niż 12 tygodni.

3. W przypadkach, o których mowa w ust. 1 pkt 1 i 2, przerwania ciąży dokonuje lekarz w szpitalu.

4. Do przerwania ciąży wymagana jest pisemna zgoda kobiety. W przypadku małoletniej lub kobiety ubezwłasnowolnionej całkowicie wymagana jest pisemna zgoda jej przedstawiciela ustawowego. W przypadku małoletniej powyżej 13 roku życia wymagana jest również pisemna zgoda tej osoby. W przypadku małoletniej poniżej 13 roku życia wymagana jest zgoda sądu opiekuńczego, a małoletnia ma prawo do wyrażenia własnej opinii. W przypadku kobiety ubezwłasnowolnionej

Ustawa z 7.01.1993 r. o planowaniu rodziny, ochronie płodu ludzkiego i warunkach dopuszczalności przerywania ciąży.

- ✓ **podmiotowość prawna dziecka nienarodzonego**
terminu „płód” i „dziecko poczęte”
jako kategorie prawne
- ✓ **Ustawa o rzeczniku praw dziecka (z 6.01.2000 r.) artykuł 2L** określa, że „dzieckiem jest każda istota ludzka od poczęcia do osiągnięcia pełnoletności”.
- ✓ **Kodeks karny (np. art. 157a)**
mówi m.in. o karze obowiązującej w przypadku uszkodzenia ciała dziecka poczętego

Priorytetowym wyznacznikiem moralnej oceny diagnostyki prenatalnej powinno być dobro matki oraz dobro poczętego dziecka, w tym poszanowanie jego godności i prawa do życia.

Aspekty etyczne diagnostyki prenatalnej

Dylematy etyczne – godność i autonomia osoby nienarodzonej, ale również prawo do autonomii pacjentki/partnera

Wątpliwości kobiet na konsultacji przed diagnostyką

- ✓ Czy wykonywać diagnostykę prenatalną ?
- ✓ Lepiej wiedzieć czy nie ?, więcej stresu niż korzyści ?
- ✓ Czy warto wykonać NIPT ? (kontrowersje - badanie płci - aborcja ?

Wątpliwości kobiet na konsultacji po wyniku diagnostyki

- ✓ **poczucie winy, negatywne emocje (lęk, bezsilność, zniecierpliwienie)**
 - co dalej ?, poczucie osamotnienia, bezradności
 - kontrowersje dotyczące wczesnej terminacji ciąży
 - „koniec życia na jego początku” aborcja - eugenika („dobre” i „złe” urodzenie)

Spór ideologiczno - światopoglądowy – rola mediów

PORADNICTWO GENETYCZNE

aspekty etyczne diagnostyki prenatalnej

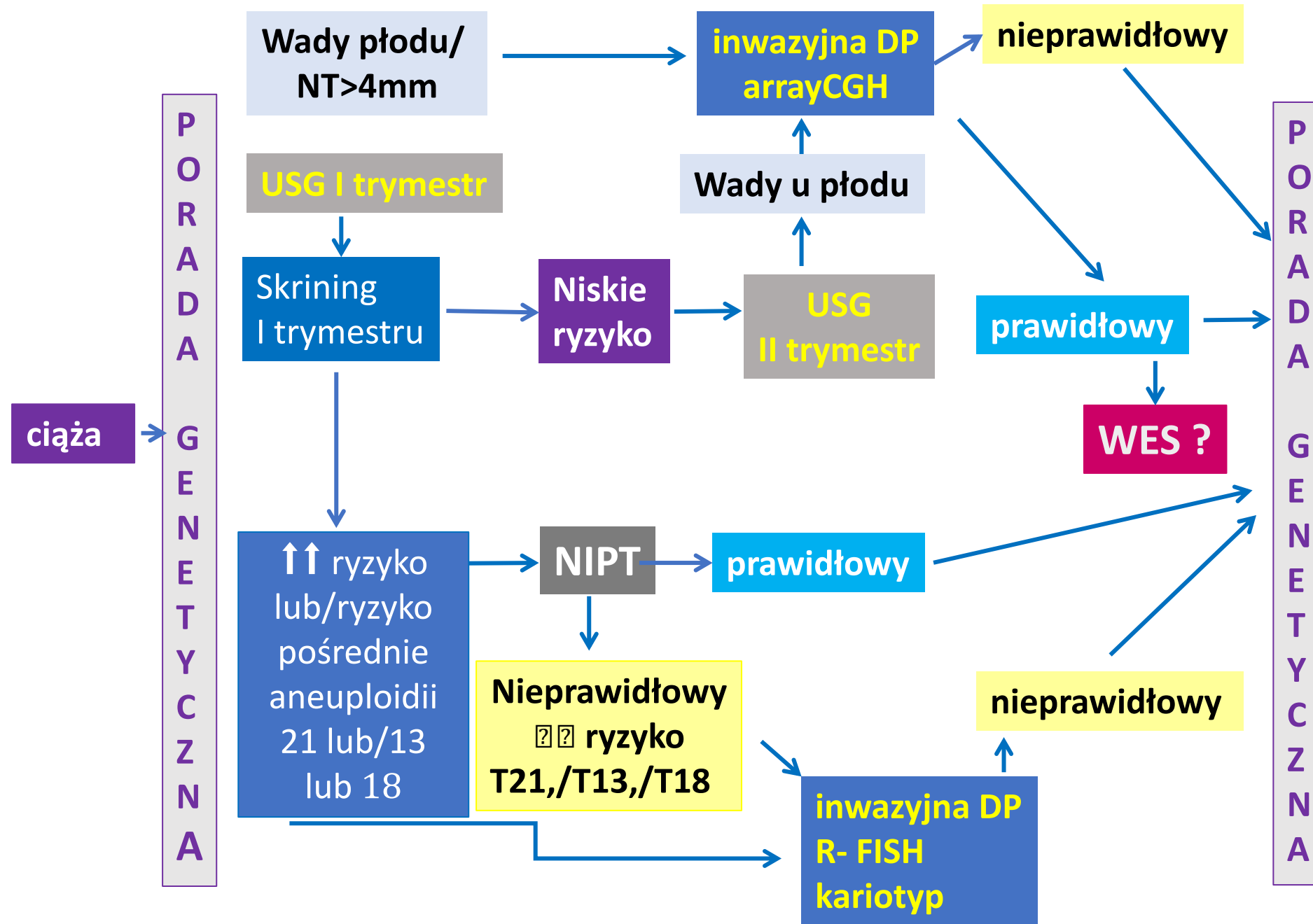
- **Zasada niedyrektywności - czy jest to możliwe ?**
- **Deklaracja świadomej zgody na diagnostykę prenatalną**
- zachowanie tajemnicy lekarskiej o wynikach badań
- poinformowanie o negatywnym wyniku diagnostyki prenatalnej
sposób i czas przekazania informacji - empatia personelu medycznego
- pomoc psychologiczna, opieka kompleksowa, w tym informacja o
opiece paliatywnej
- grupy wsparcia/ stowarzyszenia pacjentów/fundacje

W IMiD od 1998 r. działa interdyscyplinarny Zespół ds. Leczenia Płodu i Noworodka. Decyzje dotyczące opieki w ciąży , okresie

okołoporodowym, ewent. opiece paliatywnej omawiane z rodzicami

Konsylium wielodyscyplinarne:

położnik, chirurg, neonatolog, neurolog, kardiolog, radiolog,
anestezjolog, genetyk, psycholog



Algorytm diagnostyczny aneuploidii : od kariotypu do aCGH



DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ !

Testy genetyczne (badanie genomu) w diagnostyce prenatalnej - wyzwania

NGS jest coraz częściej wykorzystywane do nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej

Diagnostyka prenatalna

- Ograniczenie możliwości oceny cech dysmorficznych
- Brak możliwości pełnej prognozy neurorozwojowej
- Brak możliwości oceny ewolucji obrazu fenotypowego
- Brak wystarczających danych fenotypowo/genotypowych wad strukturalnych
- Potrzeba retrospektywnej analizy danych dotyczących poronień i ciąż obumarłych

Ograniczenia

- Interpretacja wyniku (zmiany patogenne, potencjalnie patogenne, łagodne, VOUS (niepewne))
- Możliwość zmiany klasyfikacji zmiany (z czasem)
- Wysokie koszty, brak finansowania przez NFZ

Diagnostyka prenatalna

Czy warto wykonywać skrining biochemiczny ?

Stężenie markera	Trisomia 21	Trisomia 18	Trisomia 13	Triploidia	WCN
AFP	niski	niski	prawidłowy / wysoki		wysoki
Wolna β hCG	wysoki	niski	niski		norma
PAPP-A	niski	niski	niski		norma
uE3	niski	niski	niski		norma
Inhibina A II trym.	wysoki	prawidłowy	wysoki		norma

1 MoM
norma

Marker	MoM
NT	>1,8 – 2
PAPP-A	< 0,4
β hCG	<0,4 o >2,5
AFP	<0,4 o >2,5
uE3	< 0,5