



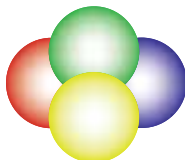
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Prenatální a perinatální laboratorní diagnostika



Dalibor Novotný
Tomáš Adam
Kateřina Adamová
Lucie Roubalová
Ivana Fellnerová

*Milý čtenáři,
publikace, kterou držíte v ruce je součástí olomouckého cyklu vzdělávacích materiálů vydávaných k projektu Od fyziologie k medicíně – integrace vědy, výzkumu odborného vzdělávání a praxe. Projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.*



Od fyziologie k medicíně

– integrace vědy, výzkumu odborného vzdělávání a praxe

CZ.1.07/2.3.00/09.0219
<http://cit.vfu.cz/fyziolmed>



Trvání projektu:

červen 2009 – květen 2012

Řešitelská pracoviště:

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Univerzita Palackého v Olomouci

Cíl projektu:

Umožnit nadstandardní vzdělávání v oblasti fyziologie a biomedicínských aplikací.

Projektová etapa 2011 region OLOMOUC



6. Téma

Prenatální a perinatální laboratorní diagnostika

Ing. Dalibor Novotný, Ph.D. • dalibor.novotny@fnol.cz
Doc. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D. • tomasadam@gmail.com
RNDr. Kateřina Adamová, Ph.D. • kadamova@post.cz
Mgr. Lucie Roubalová • lucie.roubalova@fnol.cz
RNDr. Ivana Fellnerová, PhD. • fellneri@hotmail.com

Místo konání semináře:

Oddělení klinické biochemie FN Olomouc, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
http://www.fnol.cz/oddeleni-klinicke-biochemie-a-imunogenetiky_32.html
Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny FN Olomouc, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
<http://ulgrs.upol.cz/portal/>

Termíny konání semináře:

25. listopadu 2011
28. listopadu 2011
29. listopadu 2011

Autor designu obálky a grafických úprav:

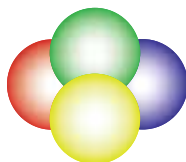
Vlastislav BÍČ, Katedra zoologie, PřF UP Olomouc

OBSAH:

1. ÚVOD	
1.1. Projekt od fyziologie k medicíně	
1.2. Projektové diskusní semináře	
1.3. Ohlédnutí za seminářem Mezinárodní možnosti	
2. PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKA VROZENÝCH VÝVOJOVÝCH VAD	
2.1. Úvod	
2.2. Neinvasivní prenatální diagnostika (skreening)	
2.2.1. Skreening v I. trimestru	
2.2.2. Skreening ve II. trimestru těhotenství	
2.2.3. Vyhodnocení screeningu	
2.3. Cytogenetická prenatální diagnostika	
2.3.1. Chromosomální aberace	
2.3.2. Invazivní techniky odběru biologického materiálu pro účel cytogenetického vyšetření plodu	
2.3.3. Rychlé diagnostické metody nezávislé na kultivaci buněk plodu	
2. 4. Preimplantační genetická diagnostika	
3. DĚDIČNÉ METABOLICKÉ PORUCHY A TĚHOTENSTVÍ	
3.1. Úvod	
3.2. Dědičné metabolické poruchy matky – vliv na mateřský organismus	
3.2.1. DPM vedoucí k poruchám reprodukce	
3.2.2. DPM postihující organismus matky	
3.3. Dědičné metabolické poruchy matky – vliv na vývoj zdravého plodu	
3.4. Metabolické poruchy plodu	
3.5. Novorozenecký screening dědičných metabolických poruch	
4. KONGENITÁLNÍ INFEKCE	
4.1. Úvod	
4.2. Přehled nejčastějších kongenitálních infekcí	
4.3. Kongenitální toxoplazmóza	
4.3.1. Toxoplazma gondii: morfologie a životní cyklus	
4.3.2. Toxoplazma gondii: epidemiologie a patogeneze	
4.3.3. Laboratorní diagnostika toxoplazmózy	
4.3.4. Prevence a terapie toxoplazmózy	
4.4. Cytomegalovirus: charakteristika, patogeneze, kongenitální infekce	
4.4.1. Laboratorní diagnostika kongenitální infekce CMV	
4.4.2. Ostatní herpetické viry	
4.5. Parvovirus B19: charakteristika životní cyklus, kongenitální infekce a klinické projevy	
4.5.1. Kongenitální infekce parvovirem B19	
4.5.2. Laboratorní diagnostika infekce parvovirem B19	
4.6. Závěr	
5. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA	
Seznam zkratk	

6. téma

Prenatální a perinatální laboratorní diagnostika



1. ÚVOD

Projekt Od fyziologie k medicíně
Projektové diskusní semináře
Ohlédnutí za seminářem Mezinárodní možnosti

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ
Integrace vědy, výzkumu, odborného vzdělávání a praxe



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

1.1. Projekt Od fyziologie k medicíně

Projekt Od fyziologie k medicíně – integrace vědy, výzkumu, vzdělání a praxe je vzdělávací projekt, jehož cílem je nadstandardní vzdělávání v oblasti fyziologie a biomedicínských aplikací (<http://cit.vfu.cz/fyziolmed/>). Vzdělávání je vedeno jak v rovině teoretické (prezentace aktuálních poznatků v kontextu vzájemných souvislostí), tak v rovině praktické (experimentální praxe, metody efektivního zpracování dat, aplikace výsledků výzkumu, exkurze).

PRO KOHO je projekt určen?

- 1) **Akademické pracovníky VŠ** (školitele VŠ studentů na úrovni Bc., Mgr. a Ph.D.)
 - 2) **Studenty VŠ** (Bc., Mgr. a Ph.D.)
 - 3) **Studenty a pedagogy SŠ** (s hlubším zájmem o fyziologii a medicínu)
- Podmínkou účasti v projektu byla registrace prostřednictvím projektových webových stránek. (registrace byla uzavřena 31.12.2010)

CO projekt nabízí?

- 1) Odborné vzdělávání formou **diskusních seminářů (viz dále)** se zaměřením na aktuální fyziologicko-lékařskou problematiku a témata oceněná Nobelovými cenami za Fyziologii a medicínu
- 2) **Exkurze** na pracoviště vědy a výzkumu, **aktivní zapojení do experimentů**
- 3) Získání zkušeností s **atraktivní prezentací vlastních výsledků na odborných akcích** (konferencích)
- 4) Seznámení s možnostmi **mezinárodních kontaktů a uplatnění na světovém vědecko-výzkumném fóru**
- 5) Tištěné a interaktivní **publikace** k jednotlivým seminářům



Obr. 1.1. - Časový harmonogram projektu Od fyziologie k medicíně

1.2. Projektové diskusní semináře

Jednotlivé semináře probíhají v neformální přátelské atmosféře. Skládají se z **části teoretické** a navazující **části praktické**, kdy mají účastníci možnost uplatnit získané teoretické poznatky přímo v praxi.

První etapa projektových seminářů již úspěšně proběhla v regionu Brno v průběhu roku 2010. Byla garantována Veterinární a farmaceutickou univerzitou v Brně ve spolupráci s Ústavem živočišné fyziologie a genetiky AV ČR a řadou externích spolupracovníků.

V návaznosti na první cyklus projektových seminářů **realizovaných v roce 2010 v regionu Brno**, probíhá druhý cyklus seminářů v regionu Olomouc (únor-prosinec 2011). Podobně jako v brněnské etapě, probíhají olomoucké semináře ve dvou cyklech: **jarním** (4 semináře) a **podzimním** (3 semináře).

Olomoucké semináře jsou zaštiťovány odborníky z Přírodovědecké a Lékařské fakulty Uni-

verzity Palackého ve spolupráci s řadou externích spolupracovníků (vědci, lékaři, pedagogové i pracovníci biomedicínských institucí a provozů).

Všechny projektové materiály vydané pro účastníky k seminářům v regionu Brno, získají v tištěné podobě také účastníci seminářů v regionu Olomouc a naopak. Pro ostatní zájemce jsou materiály v elektronické podobě spolu s dalšími informacemi o projektu k dispozici na projektových webových stránkách: <http://cit.vfu.cz/fyziolmed/>

Časový harmonogram olomouckých seminářů je znázorněn na obrázku 1.2.a,b



Jaro 2012

Společná závěrečná konference všech účastníků projektu (brněnské i olomoucké skupiny registrovaných)

Obr. 1.2. - Časový harmonogram jarního (a) a podzimního (b) cyklu projektových seminářů v regionu Olomouc

1.3. Ohlédnutí za seminářem Mezinárodní možnosti

V květnu proběhl poslední z jarního cyklu seminářů olomoucké etapy. V teoretické části se přednášející (dr. M. Fellner, dr. B. Cvek, dr. I. Fellnerová) pokusili neformálně prezentovat různé možnosti a formy zahraniční spolupráce a zároveň se podělit o řadu osobních zkušeností i netypických zážitků s cílem pomoci studentům odbourat jejich obavy popř. nechuť získávat zahraniční zkušenosti a navazovat mezinárodní kontakty (obr. 1.3).



Obr. 1.3. - Titul doprovodné publikace (a); Prezentace dr. B Cveka (b) a doc. M. Fellnera (c) v rámci teoretická část semináře k tématu Mezinárodní možnosti

V návaznosti na teoretický seminář navštívili účastníci kurzu druhou (po Karlově univerzitě) nejstarší univerzitu v Evropě, založenou v r. 1364 v polském Krakově. Původně nesla název Královská Akademie; teprve v 19. století byla přejmenována podle dynastie polských králů na Jagellonskou univerzitu. V prezentaci prof. Marka Cegly jsme se seznámili s historií i současností univerzity, s její strukturou, a tematickým zaměřením jednotlivých fakult (*obr. 1.4.*).



Obr. 1.4. - Posluchárna Farmaceutické fakulty Jagellonské univerzity v Krakově (a); Prof. Marek Cegla – prezentace Farmaceutické fakulty Jagellonské univerzity v Krakově (b).

Po vyslechnutí prezentace prof. M. Cegly účastníci semináře navštívili výzkumné a výukové prostory Farmaceutické fakulty Jagellonské univerzity (*obr. 1.4.*).



Obr. 1.5. - Výzkumné laboratoře (a); výukové skleníky jagellonské farmaceutické fakulty (b); prostory botanické zahrady (c)

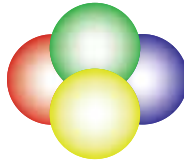




Obr. 1.6. - Skupina účastníků semináře před Farmaceutickou fakultou Jagellonské univerzity v Krakově

6. téma

Prenatální a perinatální laboratorní diagnostika



2. PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKA VROZENÝCH VÝVOJOVÝCH VAD

Úvod

Neinvazivní prenatální diagnostika - screening

Invazivní genetická diagnostika

Cytogenetická prenatální diagnostika

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ

Integrace vědy, výzkumu, odborného vzdělávání a praxe



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

2.1. Úvod

Prenatální diagnostika (PD), jako součást fetální medicíny, představuje soubor metod, které umožňují diagnostikovat vrozené vývojové vady (vvv)¹ u dosud nenarozeného jedince, resp. určit míru pravděpodobnosti jeho poškození. Prenatální diagnostika využívá spolupráce řady oborů, především biochemie, genetiky, gynekologie a porodnictví a nej-různějších zobrazovacích metod (ultrazvuk, nukleární magnetická rezonance aj.)

Přístupy PD lze rozdělit jednak z hlediska časového a z hlediska metodického (*obr. 2.1.*):

Prenatální diagnostika z hlediska časové aplikace:

- I. trimestr – diagnostika prováděná do 14. týdne těhotenství
- II. trimestr – diagnostika prováděná do 18. týdne těhotenství
- III. trimestr – diagnostika prováděná od 19. týdne těhotenství do porodu

Prenatální diagnostika z hlediska vyšetřovací metody:

- **Neinvasivní**, tzv. screeningové metody: biochemické vyšetření krevního séra matky a ultrazvuk (ultrazvuk je stále jednou z nejdůležitějších metod PD-umožňuje diagnostikovat řadu morfologických i fyziologických odchylek)
- **Invasivní**, tj. cílené metody (amniocentéza, odběr choriových klků, kordocentéza, fetoskopie)
- **Speciální**, preinplantační diagnostika embryí

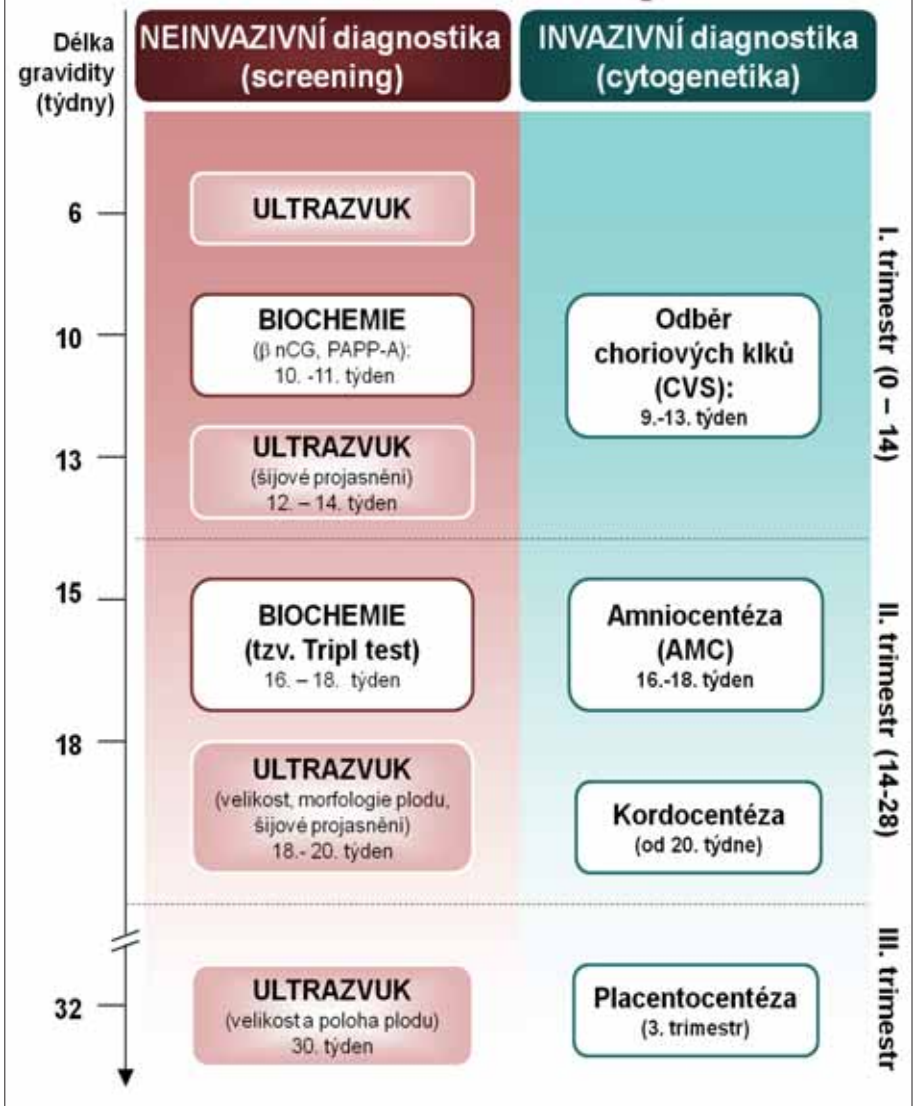
Laboratorní diagnostika vrozených vývojových vad se opírá o tzv. prenatální screening. **Screening je způsob vyhledávání skupiny pacientů se zvýšeným rizikem určitého onemocnění. Screeningový test není diagnostickým testem.**

Výsledek testu vyjadřuje pravděpodobnost postižení dosud nenarozeného dítěte. Např. riziko 1:2000 znamená, že z 2000 žen bude mít jen jedna žena dítě s vrozenou vývojovou vadou (čím je druhé číslo nižší, tím vyšší je pravděpodobnost postižení a naopak). Výsledky s vyšším rizikem postižení jsou označovány jako pozitivní, zatímco výsledky s nižší pravděpodobností postižení jsou označovány jako negativní. Hranici mezi pozitivním a negativním výsledkem určuje laboratoř, která výsledky zpracovává. Často je za hranici považována pravděpodobnost 1:50², tzn. že např. výsledek 1:30 je považován za pozitivní, zatímco výsledek 1:100 jako negativní. **Výsledkem screeningu je záchyt těhotenství s vyšším rizikem vrozených vývojových vad.** Pozitivní výsledek však v žádném případě neznamená, že plod je skutečně postižen. Na základě positivity jsou matce pouze doporučena resp. provedena specifitější vyšetření, jako amniocentéza (odběr plodové vody), biopsie choriových klků apod. Všechna tato cílená vyšetření jsou invazivní, a vždy je s nimi spojeno nějaké procento komplikací. Např. v případě amniocentézy je riziko samovolného potratu 0,5 – 1%.

¹ vrozené morfologické nebo funkční odchylky, které přesahují normální variabilitu a které mají negativní dopad na život postiženého)

² <http://porodnice.cz/co-je-prenatalni-diagnostika>

Prenatální diagnostika



Obr. 2.1. - Orientační přehled základních prenatálních vyšetření a neoptimálnější doba realizace.

Screeningový test by měl být jednoduchý a snadno proveditelný. Nezanedbatelná je i ekonomická stránka, proto by screeningový test měl být ekonomicky únosný a měl by být hrazen pojišťovnou. U prenatalního screeningu je navíc velmi důležité, aby test nebyl zatěžující ani pro matku, ani pro plod.

Před implementací screeningového testu, by měla být posouzena jeho smysluplnost. K tomu slouží několik parametrů, které screening charakterizují.

Senzitivita = detekční účinnost DR (detection range) – je definována jako podíl počtu nemocných s pozitivním testem a celkového počtu testovaných nemocných. Tento parametr nám udává pravděpodobnost pozitivity testu, je - li vyšetřovaná osoba skutečně nemocná³. Vyjadřuje procentuální část všech postižených onemocněním, kteří byli screeningem odhaleni.

Specifičnost – je definována jako podíl počtu zdravých osob s negativním testem a celkového počtu testovaných zdravých jedinců. Tento parametr znamená pravděpodobnost negativního výsledku u zdravé osoby⁴. V případě screeningu nám specifičnost určuje tzv. falešná pozitivita.

Falešná pozitivita – FPR (false positive reaction) je procentuální část screeningovaných s pozitivním výsledkem testu, u kterých však specifičtější diagnostická vyšetření ani pozdější průběh onemocnění nepotvrdí.

V ideálním případě by měl test 100% senzitivitu i specifičnost, tedy by spolehlivě oddělil skupinu zdravých od nemocných. Toho nelze v reálných podmínkách dosáhnout, proto by screeningový test měl být nastaven tak, aby jeho senzitivita byla 100% na úkor specifity. Takto nastavený screening sice zachytí všechny nemocné, ale vzhledem k nižší specifitě označíme jako pozitivní i jedince bez onemocnění s tzv. falešně pozitivním výsledkem.

Skutečná pozitivita – OAPR nám pak vyjadřuje poměr mezi správně pozitivními a falešně pozitivními výsledky. Tato hodnota je mírou prevalence choroby (jednotka 1:n).

V České republice v současné době probíhá prenatální screening v I. a II. trimestru. Jako první byl plošně zaveden screening v II. trimestru a v podobě jak ho známe dnes (tzv. Triple test) probíhá od 90. let minulého století. Screening v I. trimestru se začal provádět od r. 2000. V současné době hradí pojišťovna pouze jeden z těchto screeningů. Ve většině případů, si pacienti samy hradí screening v I. trimestru.

2.2. Neinvazivní prenatální diagnostika (screening)

2.2.1. Prenatální screening v I. trimestru

Prenatální screening v I. trimestru, označovaný jako **kombinovaný test**, se skládá ze dvou částí: biochemického screeningu a ultrazvukového měření. Celý test probíhá mezi 10. až 14. týdnem těhotenství. Výsledky dílčích testů spolu s věkem a anamnézou matky jsou vyhodnoceny počítačovým programem, který stanoví individuální riziko výskytu vrozené vývojové vady. Kombinovaný test je zaměřen především na detekci trizonií (13,18 a 21). V současné době se jedná o nejefektivnější samostatný screeningový test. Očekávaná senzitivita je 90% při 3% falešné pozitivitě.

³ Rácek J., et al.: Klinická biochemie, Praha, Galen 2006,41-45

⁴ Rácek J., et al.: Klinická biochemie, Praha, Galen 2006,41-45

Biochemický screening

Optimální načasování je mezi 10. – 11. týdnem těhotenství. Z krve matky se stanovuje hladina dvou těhotenských hormonů:

free β hCG - volná podjednotka lidského choriogonadotropinu.

V podstatě jde o degradační produkt molekuly hCG. Výhoda stanovení free β hCG je v tom, že během prvního trimestru je poměr free β hCG/hCG 1 – 4%. V druhém a třetím trimestru tento poměr klesá pod 1%. Dynamika vzestupu free β hCG je během prvního trimestru výraznější a lépe koreluje s možnou patologií především s trizomií 21.

PAPP – A (Pregnancy associated plasma protein A)

Patří do rodiny plazmatických proteinů asociovaných s těhotenstvím (PAPP). Tento enzym, metaloproteináza závislá na zinku, štěpí IGFBP – 4, 2 a 5 (inzulin like grow factor binding protein). Štěpením vznikají volné IGF, které se uplatňují při lokálních proliferčních reakcích. Tím se PAPP – A aktivně zapojuje do procesu růstu, diferenciaci a reparace, což je pravděpodobně jeho hlavní úloha během těhotenství. Jeho skutečná biologická funkce zatím není úplně jasná. Během těhotenství je produkován buňkami syncytiotroblastu⁵ ve formě dimerického tetrameru. Dvě molekuly PAPP – A jsou spojeny disulfidickými můstky se dvěma molekulami glykosilované proformy hlavního bazického eozinofilního proteinu (pro MBP). Syntéza PAPP – A byla prokázána i mužů a netěhotných žen, ale pouze v homodimerické formě nevázané s pro MBP. Syntéza v těhotenství byla prokázána již během 7. týdne a pokračuje až do porodu. Snížené hodnoty jsou signifikantní pro trisomie pouze během I. trimestru, po 14 týdnu těhotenství je snížení hodnot již diagnosticky nevýznamné.

Ultrazvukový marker - Nuchální translucence (NT)

Provádí se mezi 11. a 14. týdnem těhotenství.

Nuchální translucence neboli šíjové projasnění je měření vzdálenosti mezi oblastí krku a podkožím. V této oblasti se hromadí tekutina, která se na ultrazvuku zobrazuje jako projasnění. Přítomnost většího množství tekutiny v tomto prostoru je spojena s přítomností trisomie, především trisomie 21. Vyšetření je velmi náročné na kvalitu přístroje a na vyškolení sonografisty (*obr. 2.2.*).



Obr. 2.2. - Fyziologický (a) a patologický (b) nálezný šíjového projasnění

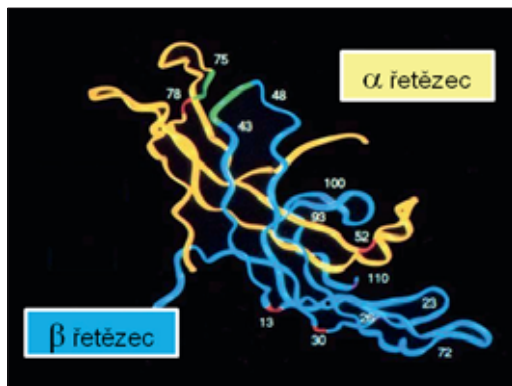
⁵ vrstva cytoplazmy s mnoha jádry bez buněčných hranic na povrchu blastocytu a celého plodového vejce

2.2.2. Prenatální screening ve II. trimestru

Ve II. trimestru se rutinně provádí tzv. triple test. Jedná se o biochemické vyšetření krve matky, kde se sledují tři markery: T-hCG, AFP a nekonjugovaného E3. Optimální načasování odběru mateřské krve je mezi 16. - 18. týdnem těhotenství.

T-hCG = lidský choriogonadotropin

Tento glykoproteinový hormon je produkován buňkami syncytiotrofoblastu. Skládá se ze dvou podjednotek α a β (obr.2.3). Podjednotka α je společná pro hormony LH, FSH a TSH⁶, podjednotka β vykazuje značnou homologii s β podjednotkou LH. Téměř identická stavba hCG a LH souvisí s jeho hlavní funkcí. Během těhotenství udržuje syntézu progesteronu v corpus luteum⁷, čímž přebírá funkci LH. Navíc společně s AFP (viz dále) navozuje imunologickou toleranci matky k plodu. Jeho syntéza se dá v krvi prokázat již 8. den po koncepci. Maximální hodnoty jsou během 8. - 10. týdne těhotenství. Poté koncentrace hCG klesá a zhruba od 22. týdne se udržuje na stejné hladině až do porodu. Zvýšené hodnoty hCG v II. trimestru provázejí Downův syndrom (trisomie 21. chromosomu), mola hydantidosa⁸, choriokarcinom⁹, ale také fyziologicky vícečetná těhotenství. Nízké hodnoty jsou typické pro Edwardsův syndrom (trisomie 18. chromosomu). Mimo to mohou také znamenat zamklý potrat nebo intrauterinní smrt plodu.



Obr. 2.3. - Molekuly lidského choriogonadotropinu (hCG)

AFP = alfa – 1 fetoprotein

Jedná se o glykoprotein, který slouží jako přenašeč látek nerozpustných ve vodě. Protože tím plní funkci albuminu bývá nazýván fetální albumin. Jeho syntéza byla prokázána již 29. den po početí. Maximálních hodnot dosahuje ve 30. – 33. týdnu gravidity. Zpočátku

⁶ LH= luteinizační hormon, produkováný adenohipofýzou; FSH= folikuly stimulující gonadotropní hormon, produkováný předním lalokem hypofýzy; TSH=tyreotropní hormon, produkováný adenohipofýzou

⁷ Žluté tělísko, vznikající po oplození z Graafova folikulu

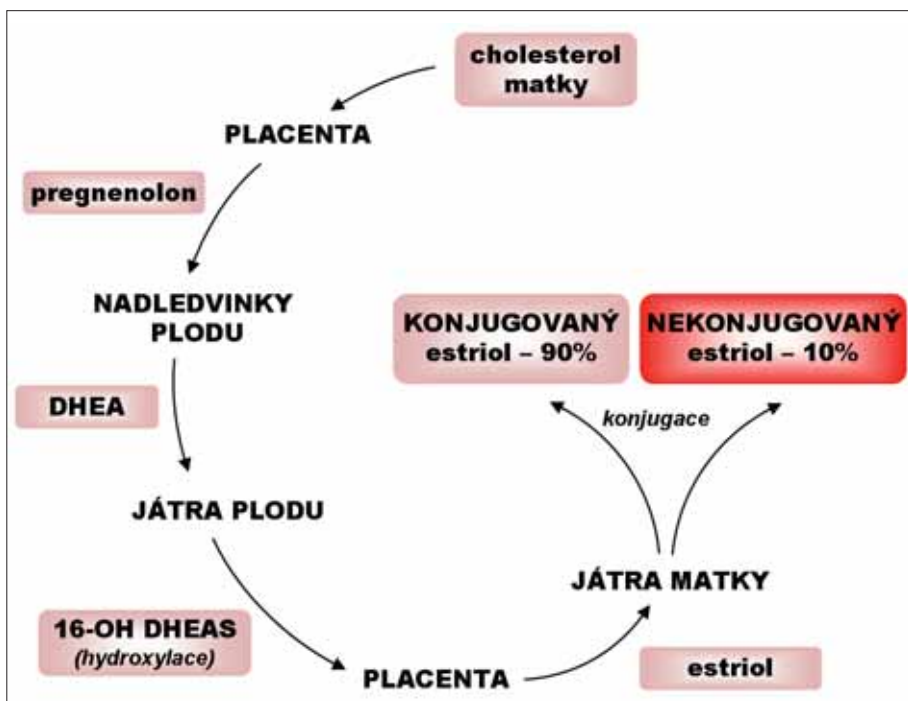
⁸ chorobná změna trofoblastu, tzv. textační trofoblastová nemoc

⁹ zhoubný nádor trofoblastu

probíhá jeho syntéza v buňkách corpus luteum, posléze především v játrech. Díky tomu slouží také jako marker patologické propustnosti fetoplacentární bariéry a odráží metabolickou aktivitu plodu. Koncentrace AFP roste u defektů kožního krytí, protože AFP volně přechází z otevřené nervové trubice do plodové vody a tím i do krve matky. Zvýšené hodnoty tedy signalizují poruchy uzávěru nervové trubice (NTD). Kromě NTD může jít o celou řadu jiných onemocnění jako hydrocefalus, omfalokéla¹⁰, hrozící potrat nebo mrtvý plod aj. Snížené hodnoty jsou typické pro Edwardův a Downův syndrom.

E3 – nekonjugovaný estriol

Patří do rodiny steroidních hormonů. Jeho detekce je možná v krvi žen pouze během těhotenství. Prekurzorem estriolu je cholesterol matky. V placentě je cholesterol metabolizován na pregnenolon a takto vstupuje do fetálních nadledvinek. Zde je přeměněn na dehydroepiandrosteron (DHEA) a sulfonován na dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS). Krví se přenáší do jater plodu a dochází k hydroxilaci za vzniku 16 – OH DHEAS. Z fetálních jater se vrací zpět do placenty, kde dojde ke konečné metabolizaci na estriol. Takto se estriol dostává do krve matky. V játrech matky je estriol konjugován a nekonjugovaná forma tvoří pouze 10% (viz obr. 2.4.).



Obr. 2.4. - Syntéza estriolu v průběhu fyziologického těhotenství

¹⁰ pupečnicková kýla

Tím, že syntéza probíhá přes placentu, nadledvinky a játra plodu, slouží estriol jako marker metabolické aktivity fetoplacentární jednotky¹¹. Nízké hodnoty svědčí pro neprospívání plodu a jsou spojeny se všemi trisomiemi a se Smith – Lemli - Opitzovým syndromem (viz dále).

2.2.3. Vyhodnocení screeningu

Hodnoty všech měřených parametrů se mění s gestačním věkem¹², proto se pomocí speciálních statistických programů přepočítávají na tzv. mom (multiplies of median) neboli násobky mediánů. Tyto mediány jsou korigovány na řadu parametrů, které se rovněž zadávají do programu. Vždy se korigují na věk a hmotnost matky. V případech vrozených vývojových vad roste riziko s věkem matky až několikanásobně (*viz tab.2.6*). Pokud to programy umožňují, lze hodnoty korigovat i na počet plodů, rasu, kouření, diabetes, umělé oplodnění apod. Výsledkem je vyhodnocení rizika pro jednotlivé vvv. Riziko se vyjadřuje poměrem 1:n (1:3000, 1:25). Hraniční hodnota cut – off pro jednotlivé choroby je stanovena podle požadavku na hodnotu falešné positivity.

Vrozené vývojové vady, které jsme schopni screeningovými testy zachytit, můžeme rozdělit do 3 skupin:

- Trisomie
- Metabolické poruchy
- Defekty kožního krytí

Trisomie

Trisomie představují skupinu genetických poruch, při kterých je určitý chromosom v buňce přítomen v počtu 3, místo normálního počtu 2. Tato situace vznikne, pokud jedna z rodičovských gamet (pohlavních buněk) nese abnormální počet chromosomů, tj. 24 místo 23, tedy $n+1$. Vzniklá zygota nese 47 chromosomů místo 46. S životem slčitelné jsou následující typy autozomálních trisomií:

Downův syndrom (DS) = trisomie 21 chromosomu

Tato trisomie tvoří přibližně polovinu všech patologií plodu. Incidence je 1:750 až 1:1000. Díky prenatalní diagnostice činila tato incidence v ČR v roce 2007 více jak 1:2500 narozených. Celková incidence (pokud započítáme i prenatalně diagnostikovaná a z těchto důvodů ukončená těhotenství) v ČR ale stoupá (*viz tab. 2.5*). Pravděpodobně je to dáno právě lepší diagnostikou a hlavně zvyšujícím se věkem rodiček¹³.

¹¹ Hájek Z., Kulovaný E., Macek M.: Základy prenatalní diagnostiky, Praha, Grada Publishing 2000

¹² délka času, po který je žena těhotná

¹³ http://www.vrozene-vady.cz/vrozene-vady/index.php?co=downuv_syndrom

Rok	Narozených dětí	Narozených s DS	DS diagn. prenatalně	Celkem DS
2001	90978	47	94	141
2003	93685	63	116	179
2006	105831	44	171	215
2008	119570	35	219	254

Tab. 2.5. - Incidence Downova syndromu v ČR (převzato z http://www.vrozene-vady.cz/vrozene-vady/index.php?co=downuv_syndrom)

Pacienti s Downovým syndromem mají charakteristický fenotyp (*obr. 2.6.*). Jsou malého vzrůstu, mají silný krk a velkou hlavu. Jejich oči jsou zešikmené kožní řasou tzv. třetí víčko, které jim dává „mongoloidní“ vzhled. Jejich dolní čelist je menší, v ústech mají velký jazyk, nos je zploštělý (velmi často mají malformaci nosní kůstky). Trpí různým stupněm mentální retardace, často se u nich vyskytují vrozené srdeční vady.



Obr. 2.6. - Downův syndrom - Morbus Down (zdroj <http://www.downsyndrom.no>)

Věk matky v době porodu	Riziko Trisomie 21	Věk matky v době porodu	Riziko Trisomie 21	Věk matky v době porodu	Riziko Trisomie 21
20	1 : 1450	29	1 : 1050	38	1 : 150
23	1 : 1400	32	1 : 700	39	1 : 110
26	1 : 1300	35	1 : 350	40	1 : 85

Tab. 2.7. - Riziko Trisomie 21 v závislosti na věku (data převzata z Morris et al 2003)

Edwardsův syndrom = trisomie 18 chromosomu

Incidence tohoto onemocnění je 3:10 000. V roce 2010 bylo v ČR diagnostikováno 5 případů (<http://www.vrozene-vady.cz/>). Jedinci s tímto syndromem jsou velmi těžce postiženi, především jsou těžce mentálně retardováni, časté jsou deformace obličeje a končetin. Podobně jako u Downova syndromu jsou přítomny vrozené srdeční vady.

Patauův syndrom = trisomie 13 páru chromosomů

Incidence onemocnění je 1:10 000. Ze všech tří syndromů je tento typ nejzávažnější. Opět zde najdeme těžkou mentální i růstovou retardaci. Typické jsou defekty očí (jsou malé a velmi blízko u sebe), někdy mohou zcela chybět.

V ČR za rok 2010 nebyl zaznamenán jediný případ (<http://www.vrozene-vady.cz/>).

Edwardův i Patauův syndrom vedou k tak závažným poškozením, že většina takovýchto těhotenství je ukončena spontánním potratem.

Metabolické poruchy

Do skupiny metabolických vvv, které jsme schopni identifikovat pomocí screeningu, patří pouze Smith – Lemli – Opitzův syndrom.

Syndrom byl poprvé popsán v roce 1964. Je to autozomálně recesivní onemocnění, které patří k nejčastějším vrozeným metabolickým vadám. Řadí se do skupiny defektů post squalenové biosyntézy cholesterolu. V tomto případě se jedná o defekt enzymu 7 – dehydrosterol reduktázy. Cholesterol je hlavní složkou buněčných membrán a myelinu a je prekurzorem všech steroidních hormonů a žlučových kyselin, proto má tato porucha velmi pestré klinické projevy¹⁴. *Více viz kap. 3. Dědičné metabolické poruchy.*

Defekty kožního krytí

Tato skupina vrozených vývojových vad se projevuje malformací mozku, míchy a břišní stěny. Prenatální diagnostika je založena na vyšetřování hladin AFP v krvi matky, které je součástí screeningu v II. trimestru, a ultrazvukovém vyšetření. Pomocí screeningu detekujeme:

- **Defekty neurální trubice NTD (neural tube defects).** Příčinou těchto vrozených vad je porucha vývoje neurální trubice. Největší skupinu tvoří rozštěpy páteře – spina bifida. Podstatou tohoto onemocnění je porucha uzavření páteřního kanálu. Existují dvě formy. Lehčí uzavřená, překrytá kůží a těžší otevřená, která postihuje míchu
- **Anencefalie**, kdy zcela chybí části mozku a **encefalokéla**, při které jsou poškozeny membránové a kostěné obaly mozku (Hájek, Kulovaný, Macek, 2000). Incidence těchto onemocnění je 3:1000. V období 1961 – 2005 bylo v České republice diagnostikováno celkem 2 647 případů spina bifida, z toho bylo 400 případů diagnostikováno prenatálně a těhotenství bylo předčasně ukončeno pro tuto diagnózu (http://www.vrozene-vady.cz/vrozene-vady/index.php?co=spina_bifida).

Integrací výsledků I. a II. trimestru získáme **tzv. Integrovaný screening**. Očekávaná senzitivita je až 95% při 3% falešné pozitivitě. Výhodou tohoto testu je vyšší senzitivita a detekce všech zmíněných vvv.

¹⁴ Kelley RI., Hennekem RC.: The Smith – Lemli – Opitz syndrom, J Med Genet 2000 May; 37 (5):321 – 335

Závěr

Prenatální diagnostika je v ČR na velice dobré úrovni. Tím, že je prenatální screening zaveden plošně, se výrazně snižuje incidence těchto onemocnění při narození. S některými syndromy se již ve statistikách nepotkáme. Otázkou je strategie přístupu. V současné době existují v ČR dva prenatální screeniny. Lékař i těhotná žena si mohou vybrat buď jeden nebo oba screeniny během těhotenství. Pojišťovna hradí pouze jeden, proto pokud se těhotná žena rozhodne pro oba, musí si jeden uhradit sama. Většina gynekologů se přiklání k provádění screeningu v I. trimestru, protože je mnohem senzitivnější a pokud se prokáže trisomie, je možno ukončit těhotenství relativně brzy. Na druhé straně tímto screeninem odhalíme pouze trisomie, ale už ne defekty neurální trubice či Smith – Lemli – Opitzův syndrom. Pokud je k dispozici zkušený sonografista s kvalitním ultrazvukem je možno vynechat screening v II. trimestru a pomocí ultrazvukového vyšetření diagnostikovat defekty neurální trubice. Ve většině ordinací bohužel není k dispozici odpovídající vybavení, a proto se stále jeví jako neefektivnější provádět oba screeniny a následně provést integrovaný test.

Literatura

RACEK J., ET AL.: Klinická biochemie, Praha, Galen 2006,41-45
MORRIS JK., WALD NJ., MUTTON DE., ALBERMAN E.: Comparison of models of maternal - age specific risk for Down syndrom live births, Prenat Diagn, 2003: 23(3): 252 – 8
HÁJEK Z.,KULOVANÝ E., MACEK M.: Základy prenatální diagnostiky, Praha, Grada Publishing 2000
KELLEY RL., HENNEKEM RC.: The Smith – Lemli – Opitz syndrom, J Med Genet 2000 May:37 (5):321 – 335
<http://www.vrozene-vady.cz>

2.3. Cytogenetická prenatální diagnostika

Analýza chromosomů plodu - tzv. prenatální cytogenetická analýza, patří mezi nejčastější prováděná vyšetření v rámci prenatální laboratorní diagnostiky. Bývá také nazývána „zlatým standardem“, protože navzdory dynamickému rozvoji nových technologií, zůstává nejkompexnější a nejlevnější vyšetřovací metodou v této oblasti.

Cytogenetická prenatální diagnostika detekuje mikroskopickou technikou změny v počtu nebo struktuře chromosomů plodu, tzv. chromosomální aberace (CHA) a jimi podmíněné patologické stavy.

2.3.1. Chromosomální aberace

Podle toho, jestli anomálie postihuje celou sadu nebo jen dílčí chromosomy, klasifikujeme CHA do dvou základních skupin:

1. **Numerické CHA** – jsou způsobené abnormálním počtem chromosomů v buňce
 - **Polyploidie** – násobky celé chromosomální sady. U člověka např. místo standardní diploidie ($2n = 46$ chromosomů) může patologicky vzniknout **triploidie** ($3n = 69$ chromosomů), **tetraploidie** ($4n = 92$ chromosomů)

- **Aneuploidie** – změna se netýká celé sady ale jen jednoho nebo několika chromosomů. Mluvíme např. o **trisomii** (jeden z chromosomů se vyskytuje ve třech kopiích)
- 2. **Strukturní CHA** – jsou způsobené chromosomálními zlomy. Výsledkem může být ztráta, zdvojení nebo přestavba původního chromosomu.
- **Balancované CHA** - při přestavbě chromosomu je zachováno původní množství genetického materiálu (inverze, translokace).
- **Nebalancované CHA** - během zlomu chromosomu se změní původní množství DNA (např. dalece, duplikace, kruhový chromosom aj.)

Chromosomální aberace jsou významnou příčinou vrozených vývojových vad i prenatální a perinatální morbidity (nemocnosti) a mortality (úmrtnosti). Vyskytují se přibližně u 0,6 % živě narozených dětí. Více než polovina spontánních potratů u klinicky rozpoznávaných gravidit je způsobena chromosomálními aberacemi, které jsou tak závažné, že nejsou slučitelné s životem (letální formy CHA).

U embryí vyšetřovaných v rámci preimplantační genetické diagnostiky (*viz kap. 2.4.*) jsou chromosomální aberace, zejména aneuploidie, detekovány až u 70 %.

Podle svého charakteru mají CHA různý dopad na fenotyp svého nositele:

- **Bez efektu** mohou být některé CHA typu inverze, balancované translokace nebo minoritní gonosomální mosaicismus.
- **Neslučitelnost s postnatálním životem** mají např. polyploidie a aneuploidie většiny autosomů.
- **Různý typ a rozsah postižení plodu** způsobují např. různé typy strukturních abnormalit, aneuploidie některých chromosomů, mosaiky, velké nebalancované translokace, delecce, duplikace aj. Mohou tak vznikat:
 - ◇ poruchy vývoje centrální nervové soustavy
 - ◇ mentální nebo psychomotorická retardace
 - ◇ růstová retardace, skeletální anomálie,
 - ◇ deformity končetin a prstů, polydaktylie
 - ◇ poruchy reprodukce nebo sterilita
 - ◇ poruchy vývoje genitálu
 - ◇ vrozené srdeční vady
 - ◇ anomálie ledvin, trávicího traktu a dalších orgánů
 - ◇ dysmorfické obličejové rysy - např. šikmé postavení očí, rozštěp rtu, patra aj.
 - ◇ poruchy nitroděložního vývoje plodu, spontánní potraty
 - ◇ poruchy imunity
 - ◇ zhoršená prognóza a zkrácení délky života

Chromosomální abnormality obvykle ovlivňují větší počet genů. Geny se mohou buď vyskytnout ve změněném počtu kopií nebo být deletovány, přerušeny nebo spojeny s dalšími geny resp. jejich částmi. Proto tyto aberace zpravidla nezpůsobují jeden izolovaný defekt, ale mnohočetná postižení různých orgánových soustav a fenotypové projevy jimi podmíněné mívají charakter syndromů.

2.3.2. Invazivní techniky odběru biologického materiálu pro účely cytogenetického vyšetření plodu

Cytogenetické vyšetření plodu bývá prováděno nejčastěji v prvním nebo druhém trimestru těhotenství. Jeho cílem je získat karyotyp plodu a na základě detailní chromosomální analýzy vyloučit nebo potvrdit přítomnost CHA, podmiňující vznik vrozené vývojové vady. Vyšetření se provádí nejčastěji z následujících indikací:

- věk matky ≥ 35 (v době porodu)
- abnormální biochemický screening (riziko Downova syndromu 1: 250 či 350)
- abnormální ultrazvukový nález (u plodu změněné množství plod.vody)
- nosičství balancované CHA u rodiče (riziko nebalancované CHA u potomka)
- psychologická (např. předchozí gravidita s CHA)
- molekulární diagnostika geneticky podmíněné choroby

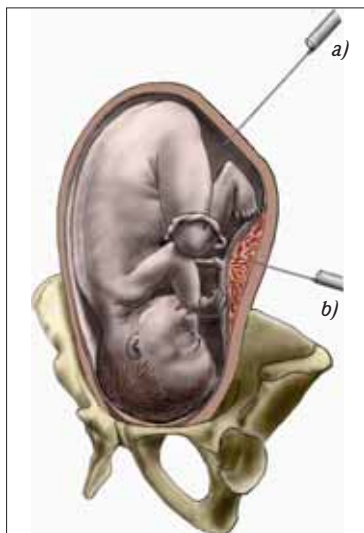
Prenatální cytogenetické vyšetření je založeno na úspěšné kultivaci a poté karyotypizaci buněk plodu, které se získávají pomocí některé invazivní metody. A to buď odběrem plodové vody (amniocentéza), biopsií choriových klků (CVS) či pupečnickové krve (kordocentéza).

Amniocentéza (AC)

AC je nejobvyklejší technika odběru biologického materiálu plodu pro cytogenetické vyšetření. Provádí se ve II. trimestru gravidity po 16. týdnu, méně obvyklá je časná amniocentéza, kterou lze provést kolem 14. týdne gravidity.

Výchozím materiálem pro cytogenetickou analýzu jsou buňky plodu, které se v průběhu těhotenství dostávají do plodové vody (amnia). Jedná se o buňky různého původu: z kůže, membrán amnia, bronchopulmonálního, gastrointestinálního a uropoetického systému plodu.

Po odběru cca 20 ml plodové vody, prováděném transabdominálně (přes břišní stěnu) pod ultrazvukovou kontrolou (**obr. 2.8.**), je odebraný vzorek v cytogenetické laboratoři kultivován podle příslušných protokolů. Veškerá laboratorní činnost je, stejně jako u ostatních kultivačních technik, prováděna sterilně, aby nedošlo během manipulace se vzorkem k jeho kontaminaci. Po přibližně 8 - 10 denní kultivaci, dochází k nárůstu buněčných kolonií (fibroblastoidní, fibroepiteloidní, nebo epiteloidní). Kvalita a kvantita kolonií se průběžně hodnotí a po dostatečném nárůstu je mitotická aktivita buněk zastavena, preparát se zpracovává a finální sediment se fixuje na mikroskopická skla. Ta jsou barvena standardními pruhovacími technikami (nejčastěji G- banding), které umožňují podrobné mikroskopické hodnocení chromosomální struktury.



Obr. 2.8. - Technika odběru plodové vody - amniocentéza (a) a odběr pupečnickové krve - kordocentéza (b).
Zdroj: www.porodnice.cz/co-je-prenatalni-diagnostika

Odběr choriových klků (CVS)

CVS (z angl. chorionic villus sampling) je technikou, kterou lze bezpečně provádět již v I. trimestru gravidity od 11. týdne. Vzhledem k tomu, že výsledný karyotyp je dostupný v časných fázích těhotenství, stává se tato metoda na našem pracovišti nejčastěji prováděným invazivním výkonem.

Výchozím biologickým materiálem pro cytogenetické vyšetření jsou buňky syncytiotrofoblastu¹⁵ nezralé placenty, které jsou získány biopsií provedenou transabdominálně pod ultrazvukovou kontrolou. Vzorek je v laboratoři očištěn od příměsí mateřské krve a kultivován podle některého z protokolů. Nejčastější je metoda tzv. dlouhodobé kultivace, využívající fibroblastů kultivovaných z mezenchymálních buněk mezodermu. Po dostatečném nárůstu buněčných kolonií (cca 10 - 14 dnů) se preparáty zpracovávají, fixují, barví a analyzují stejně, jako je uvedeno u AC.

Kordocentéza

Vyšetřovaným materiálem je krev z pupečnicku (vena umbilicalis) plodu (obr. 2.8.). Kordocentéza je metodou pozdního II. trimestru, bývá prováděna až po 20. týdnu gravidity. Jedná se o technicky náročný odběr, který vyžaduje erudici operátora a kvalitní ultrazvukový přístroj. Odebraný vzorek bývá často kontaminován příměsí mateřské krve a jeho čistotu je nezbytné ověřit.

Cytogenetické vyšetření je prováděno z lymfocytů fetální krve metodou 72 hodinové kultivace, analogicky jako u postnatálního vyšetření lymfocytů periferní krve. Karyotyp plodu je získán během 4 dnů a hodnocen stejně jako u výše zmíněných metod.

2.3.3. Rychlé diagnostické metody nezávislé na kultivaci buněk plodu

Výsledný karyotyp z klasické kultivace je dostupný přibližně do 10 dnů po odběru fetálního materiálu. V případech, kdy se u plodu předpokládá některá z chromosomálních aberací, je nutné co nejrychleji rozhodnout o dalším vedení takovéto gravidity. Situace, které vyžadují rychlé řešení, jsou následující:

- pozitivní biochemický screening, patologický ultrazvukový nálezn, případně pokročilý věk matky, indikující vysoké riziko autosomální trisomie.
- prenatalní chromosomální diagnostika je indikována, ale délka těhotenství již přesáhla 22. týden. Čekání na výsledek kultivace by představovalo překročení 24. týdne gravidity, který je limitem pro ukončení těhotenství z důvodu genetické indikace.
- těhotná žena je ve velkém stresu kvůli očekávaným výsledkům z chromosomální analýzy fetálních buněk. Zvláště se jedná o ženy, u kterých byla diagnostikovaná chromosomální aberace v předchozí graviditě.

Tyto komplikované případy umožňují řešit metody FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) a QF PCR (kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce), kterými je možné odhalit aberaci v počtu chromosomů z fetálních buněk bez jejich předchozí kultivace a tím výrazně zkrátit dobu dostupnosti výsledků vyšetření.

¹⁵ Vrstva cytoplazmy s mnoha jádry bez buněčných hranic na povrchu blastocytu a celého plodového vejce

Tyto metody otevírají cestu k cílenému testování a takto získaný výsledek je dostupný během 2 dnů. Také umožňují detekci aneuploidie u preparátů špatné kvality nebo tam, kde z různých důvodů kultivace selže. V závislosti na indikaci, se kterou pacientka přichází, pak lze předejít opakovanému odběru fetálního materiálu, který bývá spojen s rizikem spontánního abortu (pro tyto případy je vhodné uschovat část odebraného vzorku pro další použití, dokud není znám výsledek). Ani jedna z těchto technik však není v současné době schopna nahradit vyšetření celého karotypu.

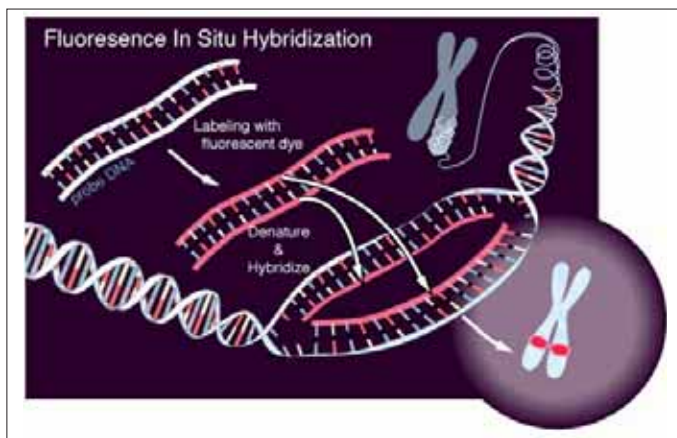
FISH (fluorescence in situ hybridisation)

FISH je moderní, spolehlivá, molekulárně cytogenetická metoda, která má široké spektrum použití v prenatalní diagnostice, postnatalní diagnostice, onkogenetice atd. FISH využívá in situ hybridizace fluorescenčně značených sond s analyzovanou chromosomální DNA probanda¹⁶, na základě vzájemné vazebné komplementarity.

Jako sondu (průbu) označujeme úsek jednořetězcového vlákna DNA, který bývá nejčastěji značený fluorescenčně a je komplementární k vyšetřované DNA. Sondy mohou být:

- **centromerické** - hybridizují s vysoce repetitivními sekvencemi tzv. alfa a beta-satelitní DNA, která je přítomná v centromerických oblastech lidských chromosomů
- **celochromosové**, označované také jako malovací - hybridizují po celé délce chromosomu
- **lokusově specifické neboli genové.**

Schematicky je princip FISH znázorněn na *obrázku 2.9*.



Obr. 2.9. - FISH - (fluorescence in situ hybridisation)

Vzorek DNA (metafázní chromosomy nebo jádra v interfázi), fixovaný na podložní sklíčko, je nejprve denaturován (oddělení komplementárních vláken standardně uspořádaných do dvoušroubovice DNA). Stejně tak je denaturována i fluorescenčně značená sonda, která se poté přidává k denaturovanému vzorku. Dochází k procesu zvanému hybridizace, kdy se sonda preferenčně

navazuje na cílová místa analyzované DNA (angl. reannealing). Po následném odmytí (odstranění nespecificky navázaných zbytků sondy) a podbarvení je preparát vizualizován ve fluorescenčním mikroskopu, kde jsou části detekovaných chromosomů zobrazovány jako jasné světelné signály v barvě použitých fluorochromů.

V prenatalní diagnostice je metoda FISH nejvíce využívána k rychlému vyloučení aneuploidie, velmi užitečná je také při odhalování chromosomálních přestaveb a mosaik. Rychle testovat vybrané aneuploidie metodou FISH můžeme na interfázních jádrech (tedy na klidových jádrech

¹⁶ vyšetřovaný jedinec, potenciální nositel genetické vady; „ten, kdo je vyšetřován“

nedělicích se buněk) nejčastěji z nekultivovaných amniocytů. FISH na metafázních chromosomech (dělicí se jádra) umožňuje také diagnostiku strukturálních změn na submikroskopické úrovni (např. mikrodeleční syndromy jako jsou např. Prader - Willi, Angelmanův syndrom), které nejsou klasickou cytogenetikou analýzou odhalitelné nebo stanovení původu markeru chromosomu. Výsledky získané touto metodou jsou dostupné zpravidla do 24 hod.

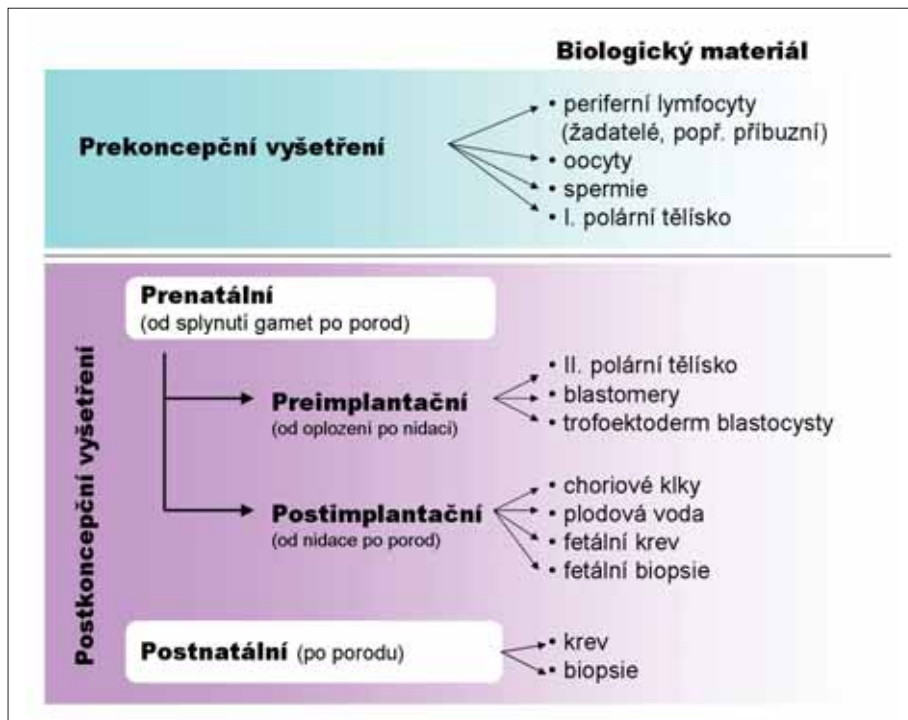
Komplikace FISH

Kontaminaci vzorku maternální tkání při hodnocení preparátu nelze odlišit maternální buňky od fetálních.

QF PCR (kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce)

Metoda QF PCR (quantitative fluorescence polymerase chain reaction) pro rychlou prenatální detekci nejčastějších aneuploidií (zahrnující chromosomy 21, 18 a 13) a pro detekci pohlaví (X, Y) je založena na využití tzv. STR (short tandem repeats - krátké tandemové repetice) markerů. Jednotlivé chromosomy jsou charakterizovány polymorfismy sekvencí mikrosatelitní DNA označovanými jako STR. Tyto sekvence DNA jsou pro účely QF PCR značeny fluorescenčně. Tato technika umožňuje rychlou detekci nejčastějších chromosomálních abnormalit z velmi malého množství fetálních buněk v ideálním případě ještě v den odběru vzorku.

Časový přehled metod genetické diagnostiky ukazuje *obr. 2.10*.



Obr. 2.10. - Formální členění genetické diagnostiky vzhledem k době provedení

Každá prenatalně odhalená odchylka v chromosomové výbavě je vždy pečlivě konzultována s těhotnou pacientkou a veškeré další úkony se provádí po jejím důkladném informování o možných důsledcích tohoto nálezu, při zvážení všech rizik a možných způsobech řešení. Je navržen další postup v péči o geneticky rizikové těhotenství. O možném ukončení gravidity v případě závažného patologického nálezu rozhoduje pacientka po domluvě s lékařem.

2.4. Preimplantační genetická diagnostika

Preimplantační genetická diagnostika (PIGD) je považována za nejčasnější formu genetické diagnostiky. Je to biomedicínská disciplína vzniklá v devadesátých letech, která umožňuje geneticky vyšetřit embryo vzniklé technikou *in vitro* fertilizace (IVF)¹⁷ v nejčasnějších stádiích vývoje, ještě před jeho transferem do mateřské dělohy, tedy před vznikem gravidity. Pod pojmem PIGD rozumíme všechna genetická vyšetření prováděná v perikoncepčním období, zahrnující jak vyšetření embryonálních buněk, tak gamet.

PIGD umožňuje párům, jejichž potomci jsou v riziku genetického postižení, mít zdravé děti, bez nutnosti umělého ukončení gravidity, jak tomu je v případě prenatalní detekce závažné genetické abnormality.

Historie PIGD

Koncem osmdesátých let minulého století bylo zjištěno, že šetrné odejmutí 1-2 blastomer z osmibuněčného embrya neovlivní jeho další vývoj.

První experimenty byly prováděny s cílem umožnit preimplantační diagnostiku onemocnění vázaných na X chromosom. První úspěšnou PIGD bylo stanovení pohlaví embryí, tzv. sexing, u přenašeček X- vázaných onemocnění, kdy bylo použito stanovení Y-specifických sekvencí pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Ve stejné době představil jiný tým odlišný přístup k PIGD - biopsii a vyšetření polárního tělíska, rovněž za účelem sexingu u X vázaných onemocnění.

V roce 1991 byla pro účely PIGD poprvé využita technika fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Metoda byla modifikována vyvinutím duální techniky, která poprvé použila současně biotinylovanou sondu k detekci chromosomu X a dvě digoxigeninem značené sondy k detekci chromosomu Y.

První preimplantačně diagnostikovanou monogenní chorobou byla cystická fibróza a jejich počet každoročně přibýval až na dnešních více než 45.

Indikace k PIGD

Preimplantační genetická diagnostika je indikována v následujících situacích:

- Přítomnost mutace způsobující některé závažné monogenní onemocnění u jednoho nebo obou partnerů
- Přítomnost vady s vazbou na X chromosom (stanovuje se pohlaví plodu)
- Přítomnost reciproké nebo Robertsonské translokace v karyotypu jednoho nebo obou partnerů

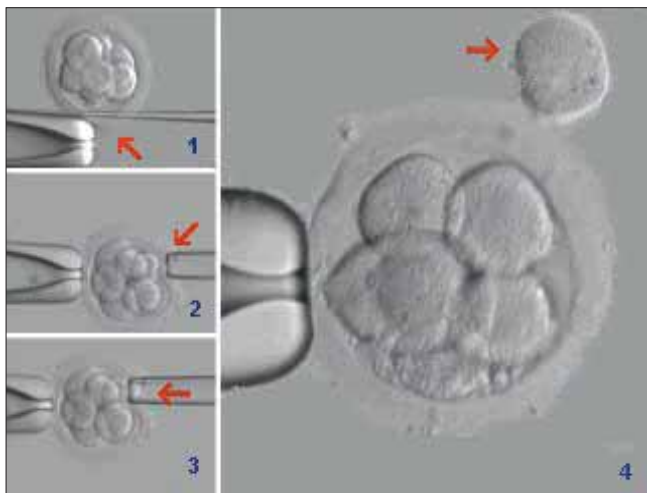
¹⁷ za zásluhy na vývoji techniky umělého oplodnění byla v r. 2010 Robert G. Edwardsovi udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu

- Neobstrukční azoospermie (testikulární selhání, kdy je produkce spermií výrazně abnormální a má za následek nepřítomnost spermií v ejakulátu)¹⁸
- Zvýšené riziko chromosomálních aneuploidií
 - ◊ nález chromosomální mozaiky v karyotypu žadatelů
 - ◊ opakované spontánní potraty v časných fázích gravidity
 - ◊ opakované selhání IVF cyklů
- Alternativně také vysoký věk matky

Příprava a zpracování biologického materiálu pro PIGD

PIGD je prováděna v rámci procesu in vitro fertilizace, jejíž bezprostřední součástí je práce se spermiemi a oocyty, proto diagnostický proces může zahrnovat také prekoncepční vyšetření gamet a polárních tělísek.

Tato vyšetření je možné provádět pouze v mezioborové spolupráci gynekologů - specialistů v oboru IVF, embryologů a genetiků za použití mikromanipulačních technik asistované reprodukce. Oploďná zygota nese jedinečný kompletní genom budoucího jedince, vytvořený splynutím rodičovských chromosomálních sad. Třetí den po in vitro oplození se považuje za nejvhodnější dobu pro biopsii blastomer (buněk embrya). Ve stádiu šesti až osmi buněk je embryo totipotentní, má nejvyšší počet nekompaktovaných blastomer a riziko jeho poškození je nejnižší. Odběr blastomer lze provádět několika možnými mikromanipulačními postupy a odebírá se jedna maximálně dvě buňky (**obr. 2.11.**) Vzhledem k tomu, že embryo lze in vitro kultivovat pouze omezenou dobu, je nutné provést diagnostické vyšetření co nejrychleji. Zatímco embryo zůstává v termostatu v kultivačním médiu, odebrané blastomery se vyšetřují s ohledem na požadovaný typ diagnózy některou z metod používaných v PIGD.



Obr. 2.11. - Postup při získávání blastomerů pro účely preimplantační diagnostiky. K získání blastomerů se používá přístroj zvaný mikromanipulátor, vybavený třemi držáky nástrojů. Na obrázku 1 vidíme prořezávání otvoru v zóně obklopující embryo, tímto otvorem vsune embryolog pipetu (obr. 2), kterou vysaje z embrya jednu blastomeru (obr. 3). Na obrázku 4 můžeme spatřit volnou blastomeru po jejím vypuzení z pipety.

Zdroj:

<http://www.repromeda.cz/preimplantacni-geneticka-diagnostika.html>

¹⁸ dříve byli tito muži považováni za neplodné; později byl prokázán výskyt spermií v testikulární biopsii

Využití metody FISH v preimplantační diagnostice

Vzhledem k tomu, že FISH lze použít nejen na metafázických chromosomech, ale také na interfázních buněčných jádrech, a že metoda není oproti PCR tak citlivá na čistotu laboratorního prostředí, začala se FISH používat od počátku devedesátých let i v PIGD.

FISH umožňuje určení pohlaví plodu. V případech, kdy matka je přenašečkou onemocnění vázaného na chromosom X, je proveden transfer pouze embryí ženského pohlaví, která jsou buď zdravá nebo chorobu přenášejí, ale nebudou touto chorobou postižena.

Dále umožňuje FISH detekci embryí, která nesou nestandardní chromosomální výbavu, jež by znamenala těžké postižení plodu nebo by byla neslučitelná s postnatálním životem. Jedná se zejména o chromosomální aneuploidie a nebalancované Robertsonské nebo reciproké translokace. Pokud je u embrya detekována chromosomální aneuploidie nebo nebalancovaná forma translokace je vyloučeno z transferu.

V současné době se k preimplantační detekci aneuploidii technikou FISH používá nejčastěji dvou komerčně dostupných kitů, z nichž každý obsahuje pět sond. Buď MultiVysion PIGT k detekci chromosomů 13, 18, 21, X, Y, nebo MultiVysion PB (Vysis Inc., USA) k detekci chromosomů 13, 16, 18, 2 a 22. K detekci samotných gonosomů se využívají většinou centromerické sondy specifické pro X a Y chromozomy. K odhalení Robertsonských translokací se používá dvou různě značených sond, první z oblasti blízké místu zlomu na jednom z translokováných chromosomů, druhou ze subtelometické oblasti druhého chromosomu. K detekci reciproké translokace jsou nutné tři sondy: dvě v místě zlomů blíž k centromere a třetí na jedné z telomer naproti místu zlomu. Dvě ze tří sond musí mít odlišnou barvu a musí být možné je použít souběžně.

Tímto způsobem lze odlišit embrya nesoucí nebalancovanou přestavbu od zdravých, nelze však odhalit nositele balancované formy translokace. Reciproké translokace jsou u různých pacientů různě a pro každý nový případ musí být zakoupena nebo připravena nová směs sond.

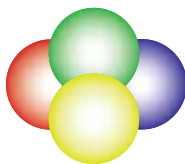
Etika a právní status PIGD

PIGD, jakkoliv je její přínos pro oblast klinické genetiky a reprodukční medicíny značný, stále vyvolává oprávněné diskuse o možném eugenickém zneužití. Pracuje se při ní především s lidskými embryi, které se na základě diagnostických výsledků rozdělují na ta, která jsou vhodná k transferu a ta, u kterých je odhalena patologie a jsou z transferu vyloučena jako „nevhodná“. Právní status embrya, kriteria hodnocení PIGD, míra „reprodukční svobody“ párů s postiženími, která nenesou závažný dopad na fenotyp potomků a zásady zacházení s „nevhodnými“ embryi jsou tématy, která jsou stálým předmětem odborných debat. Rychle přibývající nové poznatky z oblasti funkční genomiky vedou k úvaze, jaký bude skutečný dopad PIGD a k nutnosti jasně vymezit její právní rámec.

Etickými a dalšími aspekty PIGD se zabývá Evropská společnost pro lidskou reprodukci - European Society of Human Reproduction (ESHRE) PGD Consortium, která byla založena na setkání odborníků v Edinburgu 1997, jejíž řídicí výbor pravidelně sbírá, vyhodnocuje a publikuje data z evropských PIGD center.

6. téma

Prenatální a perinatální laboratorní diagnostika



3. DĚDIČNÉ METABOLICKÉ PORUCHY A TĚHOTENSTVÍ

Úvod

Dědičné metabolické poruchy matky-vliv na mateřský organismus

Dědičné metabolické poruchy matky-vliv na vývoj zdravého plodu

Metabolické poruchy plodu

Novorozenecký screening dědičných metabolických poruch

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ

Integrace vědy, výzkumu, odborného vzdělávání a praxe



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

3.1. Úvod

Těhotenství je vzhledem k rychlému růstu plodu a placenty nutričně a metabolicky velmi náročným procesem. Metabolismus matky a dítěte jsou vzájemně propojeny a vzájemně se významně ovlivňují. Dědičné metabolické poruchy (DMP) u matky či plodu tedy zásadně ovlivňují průběh těhotenství a vývoj plodu.

Většinu DMP dnes lze prenatálně diagnostikovat v prvním nebo druhém trimestru. K vyšetření možnosti DMP se přistupuje hlavně u žen, kdy je riziko známé z rodinné anamnézy. Nejčastěji tomu bývá v případech výskytu DMP u staršího sourozence. Diagnózu u plodu můžeme stanovit metodami molekulárně genetickými nebo biochemickými. V případě znalosti kauzálních mutací v příbuzenstvu představují DNA metody spolehlivý nástroj prenatální diagnostiky. Další možností je určení enzymové aktivity v tkáni, kde se příslušný enzym fyziologicky exprimuje. V praxi se používají nativní i kultivované choriové klky, kultivované amniocyty, vzácněji pak např. fetální játra nebo pupečnicková krev. V některých případech se stanovují koncentrace metabolitů přímo v plodové vodě.

Prenatální diagnostika DMP nabízí rizikovým párům možnost mít nepostižené potomstvo. Pokud je prokázána DMP u plodu, je rodině nabídnuto ukončení těhotenství. Jen ve sporadických případech bývá přistupováno k prenatální léčbě, např. podávání vitamínu B₁₂ u responsivní metylmalonové acidurie nebo fetální intravenózní a intraperitoneální suplementace cholesterolu u Smith-Lemli-Opitzova syndromu.

Indikace vyšetření DMP probíhá v následujících případech:

- opakované potraty
- nitroděložním úmrtí plodu
- intrauterinní růstové retardaci
- preeklampsie (těhotenská toxikóza projevující se hl. otoky, proteinurií a hypertenzí)
- recidivující těžké HELLP¹⁹ a AFLP²⁰,
- infarkt a abrupce (odloučení) placenty
- trombóza v šestinedělí
- defekty neurální trubice
- equinovarázní postavení nohou plodu (polohové vady/deformace nohou plodu)
- rozštěpech rtu s/bez rozštěpu patra
- kombinované vrozené vady
- mikrocefalii (abnormálně malá, symetrická hlava)
- nízká porodní váha plodu
- fetální hydrops (nadměrná vodnatelost plodu vznikající především při hemolytické anemii)
- dysgenezi corpus callosum (narušení hmoty propojující pravou a levou hemisféru)
- defekty cerebrální migrace (poruchy vývoje mozku)

¹⁹ Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets – vážná komplikace těhotenství; projevy: nevolnost, únavu, hemolýza krvácení, otoky

²⁰ Acute fatty liver of pregnancy – vážná jaterní onemocnění v těhotenství; porucha metabolismu mastných kyselin

3.2. Dědičné poruchy metabolismu matky – vliv na mateřský organismus

3.2.1. DMP vedoucí k poruchám reprodukce

Stále větší množství léčených pacientek s dědičnou metabolickou poruchou (DMP) dosahuje dospělého věku, nachází partnery a zvažuje své reprodukční možnosti. V těchto případech je po genetické konzultaci s určením rizika pro potomky indikováno gynekologické vyšetření se zaměřením na schopnost fertility.

Klasickým případem neplodnosti způsobené DMP je **galaktosémie**²¹, která bývá běžně komplikována předčasným ovariálním selháním [GITZELMANN, 2000]. Nejvhodnější cestou k vlastnímu dítěti je pak darované vajíčko. V poslední době vedly k úspěšnému otěhotnění stimulační rekombinantním folikuly stimulujícím hormonem.

Nejlépe popsanou metabolickou poruchou se sníženou fertilitou je glykogenóza typu I (GSD I)²². U pacientek s GSD jsou častým nálezem polycystická ovaria a sekundární oligomenorrhoa, vedoucí k subfertilitě.

K dalším DMP, u nichž byly popsány poruchy ovulace, sterilita a také habituální potrácení patří např.

- **Wilsonova choroba** - dědičné metabolické onemocnění postihující játra a nervovou soustavu
- **Hyperhomocysteinémie** – hromadění aminokyseliny homocysteinu. Vysoké krevní hladiny homocysteinu, mohou vyústit v různé trombotické komplikace, vedoucí k opakovaným spontánním potratům, abrupci placenty nebo preeklamsii (VOLLSET, 2000). Způsobuje neplodnost, která je následkem poruchy chemické reakce při průniku spermií do vajíčka.

3.2.2. DMP postihující organismus matky

Primárním cílem péče o nastávající matku s metabolickou poruchou by mělo být udržení matky v dobré kondici monitorováním dostupných metabolických markerů, sledováním váhového přírůstku a opakovaným zhodnocováním nutriční terapie v pravidelných intervalech. Fetální i maternální nároky na proteiny během těhotenství stoupají, což způsobuje větší proteinovou toleranci u žen postižených některými **organickými aciduriemi**, jako je např. leucinóza, poruchami močovinnového cyklu, metylmalonovou acidurií a homocystinurií. Nesmíme zapomenout ani na to, že ženy s metabolickými poruchami mohou být také postiženy všemi dalšími těhotenskými komplikacemi, pozorovanými u žen zdravých, např. těhotenskou hypertenzí a diabetem.

Poruchy mitochondriálních respiračních řetězců mohou mít za následek široké spektrum komplikací od nepostupujícího porodu (přes augmentaci oxytocinem) až po progresivní kardiomyopatii a encefalopatii. Těhotenství může vyvolat komplikace i u pacientek se subklinicky probíhající poruchou. Po porodu pak zpravidla dochází k odeznění klinických potíží (BERKOWITZ, 1990 YANAGAWA, 1998).

²¹ autosomálně recesivní onemocnění-porucha metabolismu galaktosy

²² defekt enzymatické aktivity glukosa-6-fosfatázy; akumulace glykogenu v játrech, svalch a ledvinách

Hyperamonémie²³ během těhotenství nebo po porodu mohou být příčinou postižení CNS. Situaci lze předcházet dietetickými opatřeními - snížením příjmu proteinů.

Hlavní snahou při léčbě **glykogenózu** (hromadění glykogenu) je předcházet hypoglykemiím (BERKOWITZ 2000, MAIROVITZ 2002), což bývá řešeno noční výživou pomocí nasogastrální sondy, suplementací kukuřičného škrobu nebo až celkovou parenterální výživou. Během těhotenství jsou kontraindikovány inhibitory angiotensin-konvertujícího enzymu, užívané při poruchách metabolismu glykogenu, neboť mohou způsobit postižení ledvinných funkcí plodu. Jejich vysazením však vystavujeme matku riziku výskytu renálních komplikací a hypertenze. V důsledku této nedostatečné kontroly metabolismu pak může dojít k progresi trombocytopenie a riziku velké krevní ztráty při porodu.

Laktátová acidóza spolu s hypoglykemií se vyskytuje jako důsledek deficece dehydrogenázy acyl-CoA kyselin se středně dlouhým řetězcem (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency; porucha β -oxidace mastných kyselin). Jako léčba se používají glukózové infuze, suplementace karnitinu a vitamínu B12.

Anémie a trombocytopenie se může vyskytnout při lysinurické intoleranci proteinů (transportní porucha dibazických aminokyselin). Onemocnění bývá často komplikováno preeklampsií a zvýšeným rizikem peripartální hemoragie (krváčení během těhotenství). Progrese anémie a trombocytopenie v souvislosti s těhotenstvím může vést k silnému poporodnímu krvácení u Gaucherovy choroby typu I. Hemoragické komplikace u pacientek s tímto onemocněním jsou ale naopak vzácné, jestliže v období před těhotenstvím podstoupily splenektomii. Dalším charakteristickým znakem této poruchy během gravidity je hepatomegalie, která může vést k rozvoji portální hypertenze a ascitu (tekutina v dutině břišní) (FASOULIOTIS, 1998).

3.3. Dědičné poruchy metabolismu matky – vliv na vyvíjející se zdravý plod

Nejznámějším případem, kdy DMP matky negativně ovlivňuje vývoj plodu jsou **poruchy metabolismu fenylalaninu**, který se hromadí v tělních tekutinách a poškozuje především CNS plodu (maternální hyperfenylalaninémie – HPA, maternální fenylketonurie - PKU). Většina fenylketonuriček nedrží v dospělosti nízkofenylalaninovou dietu. Tato skutečnost v kombinaci s nepříznivým plazmatickým fetálně/maternálním gradientem fenylalaninu způsobuje poškození duševního vývoje plodu. Riziko mentální retardace dítěte je tak zvýšeno až 20krát. Pro mikrocefalii a vrozené srdeční vady je toto riziko 15ti násobné. Nízká porodní váha, ageneze corpus callosum a faciální dysmorfie jsou dalšími možnými důsledky vysoké hladiny fenylalaninu v krvi matky v době těhotenství. Přísná dietní opatření tři měsíce před početím a během těhotenství snižují riziko postižení plodu na srovnatelné s normální populací (LENKE 1980, DROGARI, 1987), Management těhotenství pacientky s HPA/PKU musí být svěřen do rukou odborníka s dostatečným laboratorním zázemím.

²³ skupina dědičných metabolických poruch, u kterých dochází k narušení detoxifikace amoniaku v organismu za vzniku močoviny

Podobně i neléčená tyrozinémie II. typu u matky může mít za následek narození dítěte s mikrocefalií, hypoplázií²⁴ horní čelisti a opožděným mentálním vývojem. Pozitivní efekt má dieta bez fenylalaninu a tyroxinu.

Poruchy metabolismu homocysteinu jsou spojeny s vyšším rizikem postižení plodu srdečními vadami, defekty neurální trubice, dysmorfii a mohou vést i k úmrtí plodu. Ke snížení rizika výskytu těchto komplikací je třeba podávat folát a vitaminy B⁶ a B₁₂ dva měsíce před koncepcí a v I. trimestru těhotenství (VOLLSET, 2000).

Také metylmalonová acidémie je spojována s nitroděložní růstovou retardací a poruchou růstu postnatálně, mentální retardací, postnatální dysbalancí tekutin a kómatem.

Na tomto místě je nutno se zmínit o další rizikové skupině, která se nepřímo vztahuje k metabolickým poruchám. Zdravotní rizika u matek **vegetariánek**, a především **veganek**, vyplývají zejména z nedostatečného nutričního příjmu vitaminů B₁₂ a D, některých aminokyselin, vápníku, železa, zinku, jodu, esenciálních mastných kyselin a energie. Deficitní příjem výše uvedených nutrientů může negativně zasáhnout do intrauterinního vývoje plodu a homeostázy organismu gravidní ženy. Deficit se typicky manifestuje jako těžká megaloblastická anémie a těžké poruchy myelinizace vedoucí k mentální retardaci. Úprava výživy a dodání vitamínu B12, např. vhodnou suplementací, může zabránit u vegetariánek vzniku řady podobných patologických stavů [HRONEK 2005]

3.4. Metabolické poruchy plodu

Vliv DMP plodu na vývoj dítěte

Díky matčinu normálně fungujícímu metabolismu je plod s vrozenou metabolickou poruchou většinou chráněn placentou před akumulací metabolitů, které mohou mít potenciálně teratogenní účinky. I přes tuto kompenzaci se však vyskytují případy, kdy metabolická porucha u plodu má za následek těžké vývojové postižení. Mohou to být různé vrozené malformace a strukturální defekty mozku, fetální kardiomyopatie, hydrops a také nitroděložní úmrtí plodu [WALTER, 2000].

Vady způsobující non-imunní fetální hydrops

Hydros fetalis (vodnatelnost plodu) je jedním z častých následků různých metabolických chorob plodu, např. poruchy glykosylace typu Ia (DE KONING, 1998, NISSENKORN 2001) lysosomálních strádavých chorob (BONDUELLE 1991, KOOPER 2006), Smith-Lemli-Opitzovy choroby²⁵, kongenitální erythropoetické porfyrie (DAIKHA-DAHMANE, 2001), glykogenózy typu IV a deficitu karnitinu (STEENHOUT, 1990).

Vady způsobující morfologická postižení plodu

Děti s vrozenými metabolickými poruchami se dříve považovaly za fenotypově normální při porodu, neboť typicky se dysmorfie vyvíjejí až v prvních měsících života. Dnes je jasné, že DMP mohou být spojeny s charakteristickými perinatálními fenotypovými

²⁴ neúplný/nedokonalý vývoj orgánu

²⁵ dědičné onemocnění – porucha syntézy cholesterolu; variabilní projevy, časté orgánové malformace a mentální retardace

projevy, což naznačuje, že metabolická nerovnováha in utero může narušit normální průběh fetálního vývoje. Tělesné dysmorfie, zejména faciální, byly popsány u onemocnění spojených s poruchami biosyntézy cholesterolu (Smith-Lemli-Opitzova choroba) (CUNNIFF, 1997, MAMON 1999), mevalonové acidurie, deficitu fumarázy a pyruvátdehydrogenázového komplexu (NISSEKORN 2001, ROBINSON, 1987), poruch mitochondriálních a peroxizomálních (BAMFORTH, 1994, Volpe, 1972), lysosomálních stárávých chorob poruch glykosylace typu Ia a metabolismu některých organických kyselin (glutarové acidémie typu II, 3-hydroxy-isobutyrové acidurie).

Vady postihující vývoj mozku

Vývoj mozku je komplexní a vysoce zranitelný proces. U všech fetálních poruch metabolismu, které jsou spojeny s fetálním hydropsem nebo dysmorfii, může dojít k agenezi corpus callosum. Toto postižení je dále charakteristické pro Menkesovu chorobu a neketickou hyperglycínémií. Hypoplazie cerebella a hlavně vermis souvisí s kongenitálními poruchami glykosylace typu Ia (HOLZBACH, 1995, NISSEKORN, 2001). Pontocerebelární hypoplazie byla popsána v souvislosti s deficitem enzymů respiračních řetězců (De Koning 1999). Makrocefalie postihuje děti s glutarovou acidémií typu I a chorobou Canavanové. Naproti tomu mikrocefalie byla popsána u deficitu 3-fosfoglycerátdehydrogenázy.

Vady postihující ostatní orgány

Vrozené srdeční vady, např. kardiomyopatie, se vyskytují u peroxizomálních poruch, Smith-Lemli-Opitzovy choroby, glykogenózy typu II, deficitu karnitinu nebo karnitinpalmitoyltransferázy (typ II) (DREVAL, 1994). Deficit karnitinpalmitoyltransferázy (typ II) a peroxisomální poruchy spolu s glutarovou acidémií typu II mohou být zodpovědné za tvorbu renálních cyst. Hepatosplenomegalie nebo hepatomegalie je příznakem lysosomálních stárávých chorob, peroxizomálních poruch, deficitu mevalonátkinázy nebo kongenitální erythropoetické porfyrie. Splenomegalie je vždy přítomna u Gaucherovy choroby. Katarakta se může vyskytnout při X-vázané chondrodysplasia punctata nebo mevalonátkinázovém deficitu.

Vady, které mohou vést k nitroděložnímu úmrtí plodu

O více metabolických poruchách je známo, že způsobují mrtvorozenost. Většina z nich je spojována s nonimunním fetálním hydropsem. Dodnes není žádná studie vyhodnocující DMP jako příčinu smrti in utero u nehydropických plodů, ale je pravděpodobné, že se takto děje (WAGNER, 2002). Mrtvorozenost nebo časné úmrtí plodu po porodu bylo popsáno u lysosomálních stárávých chorob, defektu mitochondriálních dýchacích řetězců, deficitu pyruvátdehydrogenázového komplexu, deficitu mevalonátkinázy, Smith-Lemli-Opitzova syndromu a u peroxisomální poruchy, jako je X-vázaná chondrodysplasia punctata.

Vliv DMP plodu na organismus matky

Velká většina DMP je autozomálně recesivně dědičná, takže matka je v takovém případě v daném znaku heterozygot. Metabolická porucha plodu proto může negativně zasáhnout také do těhotenství matky, jejíž metabolismus ji není schopen plně kompenzovat. Poruchy beta-oxidace mastných kyselin u plodu (deficit dehydrogenázy acyl-CoA

kyselin s dlouhým řetězcem a karnitinpalmitoyltransferázy typu I) mohou vést u matky k HELLP (Haemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets) a AFLP (Acute Fatty Liver of Pregnancy) (IBDAH 1999). Stav se většinou po porodu spontánně upravuje. Dítě matky s těžkým průběhem HELLP/AFLP by mělo být co nejdříve vyšetřeno na možnou poruchu beta-oxidace mastných kyselin a sledováno pro možný výskyt hypoglykémie.

3.5. Novorozenecký screening dědičných metabolických poruch

Dědičné metabolické poruchy jsou významnou příčinou mortality a dlouhodobé morbidity ve všech věkových kategoriích. Se zvyšujícím se počtem přežívajících a narůstajícím počtem diagnostikovaných pacientů je tematika mimořádně aktuální.

Aktivní vyhledávání chorob a jejich diagnostika v jejich před manifestním stadiu umožňuje, aby se tyto choroby diagnostikovaly a léčily dříve, než se stačí projevit a způsobit dítěti nevratné poškození zdraví. Včasný léčebný zásah může hrát klíčovou roli a umožnit dítěti vést normální život. Rozšířené vyšetřování metabolických poruch je prvním krokem v tomto procesu.

Od října roku 2009 probíhá v České republice nově koncipovaný, celoplošný, novorozenecký, laboratorní screening (NBS) všech narozených dětí²⁶.

Novorozenecký screening slouží k vyhledávání novorozenců se zvýšeným rizikem některých vzácných onemocnění. Díky včasnému odhalení tohoto rizika pak lze tato onemocnění diagnostikovat a léčit dříve než stačí nevratně poškodit zdraví dítěte. NBS je prováděn ve specializovaných laboratořích, v Praze, Brně a v Olomouci²⁷.

V rámci novorozeneckého screeningu se vyšetřují následující dědičné metabolické poruchy:

Poruchy metabolismu aminokyselin

- PKU - fenylketonurie, hyperfenylalaninemie
- MSUD - leucinóza

Organické acidurie

- GA I - glutarová acidurie typ I
- IVA - izovalerová acidurie

Poruchy metabolismu mastných kyselin

- MCAD - def. acyl-CoA dehydrogenázy mast. kys. se středně dlouhým řetězcem
- LCHAD - def. 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mast. kys. s dlouhým řetězcem
- VLCAD - def. acyl-CoA dehydrogenázy mast. kys. s velmi dlouhým řetězcem

²⁶ Screening je prováděn dle metodických návodů a pokynů, uveřejněných ve Věstníku č. 6, 2009, str. 7-14 – „Metodický návod k zajištění celoplošného novorozeneckého screeningu a následné péče“.

²⁷ Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie FN Olomouc, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc

Poruchy v transportu mastných kyselin

- CPT I - deficit karnitinpalmitoyltransferázy I
- CPT II - deficit karnitinpalmitoyltransferázy II
- CACT - deficit karnitinacylkarnitintranslokázy

Dále se vyšetřují:

- Endokrinní onemocnění
- Kongenitální hypotyreóza
- Kongenitální adrenální hyperplazie
- Cystická fibróza

Základní metodické kroky při NBS

Ve věku 48-72 hodin po narození se odebere několik kapek krve z patičky dítěte na speciální papírek a odešle se k analýze do laboratoře. Je nutné dodržet správný odběr 48 – 72 h po narození, dodržet zásady bezpečnosti odebíraného vzorku tak, aby nedošlo ke kontaminaci, je důležité i správné usušení vzorku KS. Takto odebraný materiál je připravený k odeslání do příslušné laboratoře. U některých novorozenců se provádí tzv. rescreening z rozhodnutí lékaře (8. – 14. den) – např. při nízké porodní hmotnosti < 1500 g, při parenterální nutrii nebo pokud matka v době těhotenství užívala léky, které by mohly ovlivnit výsledky vyšetření. Při řešení nejednoznačného nálezu screeningového vyšetření si vyžádá opakovaný odběr laboratoř.

Z krevní skvrny se vyrazí terčík o velikosti 3mm, jednotlivé terčíky se umísťují přesně podle protokolu do 96 jamkových plotniček, přidáme interní standard (MeOH + dIS) a probíhá extrakce 20 minut v termostatu při 25 st.C za stálého třepání 20 minut, poté dochází k centrifugami 10 minut. Tím je vzorek připraven k analýze.

Extrahované krevní skvrny jsou měřeny na přístroji UHPLC UltiMate 3000 RS (Dionex) ve spojení s API 4000 (AB Sciex) přímou injekcí 3 µL bez separačního kroku.

- Analyty jsou ionizovány elektrosprejem v pozitivním módu a analyzovány metodou sledování produktu rozpadu molekulárního iontu (MRM)
- Kvantifikace se provádí vztažením průměrné intenzity signálu analytu na příslušný standard pomocí software Chemoview 2.0 (AB Sciex).
- Interpretace výsledků je založena na diagnostických algoritmech

V laboratoři dědičných metabolických poruch v Olomouci bylo od počátku vyšetřováni NBS (říjen 2009) dosud zachyceno 16 dětí s pozitivním nálezem na dědičné metabolické poruchy. Nejčastější záchyt je pro onemocnění MCADD, PKU, GAI, VLCADD.

LITERATURA:

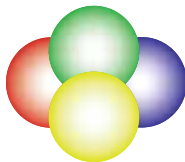
1. BAMFORTH, F.J., BAMFORTH, J.S., APPELGARTH, D.A. Structural anomalies in patients with inherited metabolic diseases. J. Inherit. Metab. Dis. 1994, 17, p. 330 - 332.
2. BERKOWITZ, K., MONTEAGUDO, A., MARKS, F., ET AL. Mitochondrial myopathy and preeclampsia associated with pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 1990, 162, p. 146 – 147.
3. BONDUELLE, M., LISSENS, W., GOOSSENS, A., ET AL. Lysosomal storage diseases presenting as transient or persistent hydrops fetalis. Genet. Couns. 1991, 2, p. 227 – 232.

4. CUNNIFF, C., KRATZ, L.E., MOSER, A. ET AL. Clinical and biochemical spectrum of patients with RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome and abnormal cholesterol metabolism. *Am. J. Med. Genet.* 1997, 68, p. 263 – 269.
5. DAIKHA-DAHMANE, F., DOMMERGUES, M., NARCY, F., ET AL. Congenital erythropoietic porphyria: prenatal diagnosis and autopsy findings in two sibling fetuses. *Pediatr. Dev. Pathol.* 2001, 4, p. 180 – 184.
6. DE KONING, T.J., DE VRIES, L.S., GROENDENDAAL, F., ET AL. Pontocerebellar hypoplasia associated with respiratory chain defects. *Neuropediatrics* 1999, 30, p. 93 - 95.
7. DE KONING, T.J., TOET, M., DORLAND, L., ET AL. Recurrent nonimmune hydrops fetalis associated with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1998, 21, p. 681 -6
8. DREVAL, D., BERNSTEIN, D., ZAKUT, H. Carnitine palmitoyl transferase deficiency in pregnancy: a case report. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994, 170, p. 1390 – 1392.
9. DROGARI, E., SMITH, I., BEASLY, M., LLOYD, J.K. Timing of strict diet in relation to fetal damage in maternal PKU study. *Lancet* 1987, ii, p. 927 - 930.
10. FASOULIOTIS, S.J., EZRA, Y., SCHENKER, J.G. Gaucher's disease and pregnancy. *Am. J. Perinatol.* 1998, 15, p. 311 – 318.
11. FERNANDES, J., SMIT, G.P.A. Glykogen storage disease. In: Fernandes, J., Saudubray, J.M., van den Berghe, G., editors. *Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and Treatment*, 3rd edition. Heidelberg: Springer, 2000, p. 87 – 101.
12. GITZELMANN, R. Disorders of galactose metabolism. In: Fernandes, J., Saudubray, J.M., van den Berghe, G., editors. *Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and Treatment*, 3rd edition. Heidelberg: Springer, 2000, p. 103 – 109.
13. HOLZBACH, U., HANEFELD, F., HELMS, G. ET AL. Localized proton magnetic resonance spectroscopy of cerebral abnormalities in children with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Acta Paediatr.* 1995, 84, p. 781 – 786.
14. HRONEK, M., KUDLÁČKOVÁ, Z. Deficient intake of nutrients and the resulting health complications in vegetarians in the course of pregnancy and lactation. *Ceska Gynecol.* 2005, 70(2), p. 161 - 1
15. İBDAH, J.A., BENNET, M.J., RINALDO, P., ET AL. A fetal fatty-acid oxidation disorder as a cause of liver disease in pregnant women. *N. Engl. J. Med.* 1999, 340, p. 1723 - 1731.
16. KOOPER, A.J., JANSSENS, P.M., DE GROOT, A.N., ET AL. Lysosomal storage diseases in non-immune hydrops fetalis pregnancies. *Clin. Chim. Acta* 2006, 371(1-2), p. 176 – 182.
17. LENKE, R.R., LEVY, H.L. Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. An international survey of the outcome of untreated and treated pregnancies. *N. Engl. J. Med.* 1980, 303, p. 1202 - 1208.
18. MAIROVITZ, V., LABRUNE, P., FERNANDEZ, H., ET AL. Contraception and pregnancy in women affected by glycogen storage diseases. *Eur. J. Pediatr.* 2002, 161(Suppl 1), p. S97 – S101.
19. MAYMON, R., OGLE, R.F., Chitty, L.S. Smith-Lemli-Opitz syndrome with persisting nuchal oedema and non-immune hydrops. *Prenat. Diagn.* 1999, 19, p. 105 – 107.
20. NISSENKORN, A., MICHELSON, M., BEN-ZEEV, B., LERMAN-SAGIE, T. Inborn errors of metabolism. A cause of abnormal brain development. *Neurology* 2001, 56, p. 1265 – 1272.

21. STEENHOUT, P., ELMER, C., CLERCX, A., ET AL. Carnitine deficiency with cardiomyopathy presenting as neonatal hydrops: successful response to carnitine therapy. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1990, 13, p. 69 – 7
22. VOLLSET, S.E., REFSUM, H., IRGENS, L.M., ET AL. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland homocysteine study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, 71, p. 962 – 968.
23. VOLPE, J.J., ADAMS, R.D. Cerebro-hepato-renal syndrome of Zellweger: an inherited disorder of neuronal migration. *Acta Neuropathol.* 1972, 20, p. 175 - 198.
24. WALTER, J.H. Inborn errors of metabolism and pregnancy. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2000, 23, p. 229 –
25. WAPNER, R.J., LEWIS, D. Genetics and metabolic causes of stillbirth. *Semin. Perinatol.* 2002, 26, p. 70 - 74.
26. YANAGAWA, T., SAKAGUCHI, H., NAKAO, T., ET AL. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes with deterioration during pregnancy. *Intern. Med.* 1998, 37, p. 780 – 783.

6. téma

Prenatální a perinatální laboratorní diagnostika



4. KONGENITÁLNÍ INFEKCE

Úvod

Přehled nejčastějších kongenitálních infekcí

Kongenitální toxoplasmóza

Cytomegalovirus

Parvovirus B19

Závěr

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ

Integrace vědy, výzkumu, odborného vzdělávání a praxe



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

4.1. Úvod

Za kongenitální neboli vrozené infekce považujeme taková onemocnění, která po zpravidla manifestním průběhu u matky přejdou také na vyvíjející se embryo nebo plod (1, Sedláček 2007). Infekce embrya nebo plodu mohou být vyvolány nejrůznějšími infekčními agens, zejména prvoky, viry a bakteriemi.

Kongenitální mohou vznikat:

1. **nitroděložně** (transplacentárním přenosem). Z časového hlediska lze intrauterinní infekce a následná onemocnění rozdělit na **gametopatie** (postižení zárodečných buněk), **blastomatózy** (onemocnění od období prvního srdečního úderu), **embryopatie** (onemocnění vznikající do 12. týdne gestace) a **fetopatie** (onemocnění plodu po 3. měsíci gravidity)
2. **perinatálně** (z vaginálních sekretů matky nebo z krve)
3. **postnatálně** (z mateřského mléka či jiných zdrojů).

Tyto stavy mohou představovat významné zdravotní riziko vývoje pro embyo nebo plod během těhotenství, popř. se mohou manifestovat až po porodu závažnými zdravotními komplikacemi novorozence, a následně pozdními projevy během dalšího života. Infekce tedy může narušit fyziologický průběh těhotenství a ovlivnit nepříznivě vývoj plodu. Z důvodu ohrožení či poškození matky, plodu nebo novorozence během terapie představuje těhotenství komplikaci v léčbě infekcí a znesnadňuje ji.

4.2. Přehled nejčastějších kongenitálních infekcí

TORCH je akronymem pro několik nejběžnějších kongenitálních infekcí:

- Toxoplazmóza,
- Other Infections (syfilis, hepatitida B, enteroviry, adenoviry, virus Epstein- Barrové, Varicella-zoster virus, lidský parvovirus B19, HIV, Listeria monocytogenes, Chlamydia trachomatis, Borrelia burgdorferi,...). Skupina se rychle rozšiřuje o další agens schopná vyvolat onemocnění.
- Rubeola
- Cytomegalovirus
- Herpesviróvá infekce

Riziko vzniku infekce je velmi rozdílné, závislé na jejím původci, imunitní kondice matky, ale také např. na gestačním období (zpravidla nepřímá úměra výše rizika s délkou gestačního období v době vzniku infekce).

Tabulky 4.1.a a 4.1.b udávají základní charakteristiku vybraných intrauterinních infekcí s popisem následných rizik pro plod, novorozence a budoucí vývoj infikovaného jedince (částečně převzato z lit.1, Sedláček 2007).

Původce infekce	Rizikové období pro plod	Vrozené onemocnění	Onemocnění novorozence	Následné komplikace	Poznámka
Rubeola	I.a II.trimestr (do 16 týdne)	Srdeční, oční mikrocefalie, malformace vnitřního ucha	Hepatosplenomegalie, trombopenie, ikterus, pneumonie, encefalitida, lymfadenopatie	Úbytek sluchu, psychomotorická retardace, diabetes, tyreopatie	Očkování v ČR od r.1986
Lidský cytomegalovirus (CMV)	I.a II.trimestr	Oční, mikrocefalie, ageneze corpus callosum, hydrocefalus	Hepatosplenomegalie, anémie, trombopenie, ikterus, pneumonie	Hluchota, psychomotorická retardace, mozkové kalcifikace	Vakcína se vyvíjí, nežádoucí účinky při léčbě gancyklovirem
Herpes simplex virus (HSV1, HSV2)	I.trimestr, perinatální období (HSV2)	Mikrocefalie	Generalizovaná infekce (CNS), diseminovaná intravaskulární koagulace encefalitida, kožní projev- exantém, hepatitida	Psychomotorická retardace	Manifestní infekce HSV genitálu matky je indikací pro porod císařským řezem, acyklovir
Varicella-zoster virus (VZV)	I.trimestr, perinatální období	Oční, mikrocefalie, atrofie končetin	Vrozená varicela, infekce ženy 5 dní před porodem a 2 dny po porodu: u 50% neonatální varicela- hemoragická s postižením jater a plic, 30% letalita	Psychomotorická retardace, zoster	Profylaxe novorozence specifickým imunoglobulinem (Varitec)
Lidský parvovirus B19	II.trimestr	Hydrops plodu	anémie		Pro PCR se využívá krev, kostní dřeň a plodová voda
Virus lidského imunodeficitu (HIV)	Perinatální období (cca 60% vertikálních přenosů)	Nebývají	Infekce HIV	AIDS, imunodeficit, oportunní infekce	Upřednostňován porod císařským řezem, zábrana kojení, definitivní rozhodnutí o nálezce až po 18 měsících života

Tab.4.1a. - Nejčastější virové kongenitální infekce.

Původce infekce/ onemocnění	Rizikové období pro plod	Vrozené onemocnění	Onemocnění novorozence	Následné komplikace	Poznámka
Toxoplasma gondii (Toxoplo- lazmóza)	I. až III.trimestr	Oční, hydroce- falus	Hepatospleno- megalie, anémie, ikterus, encefaliti- da, pneumonie,	Chorioretini- tida, křeče, psychomotorická retardace, moz- kové kalcifikace, epilepsie	Prevenčí je hygie- nický režim
Treponema pallidum (syfilis kongenitální)	Možnost transplacentár- ního přenosu od 5.měsíce	Nevznikají			
Treponema pallidum (syfilis prenatální)		Intersticiální zánět, uzávěry cév, nekrózy	Klinické projevy při narození	Postnatální komplikace: s.congenita re- cens, s.congenita tarda	Neléčené: intrauterinní nebo perinatální úmrtí, potrat
Listeria monocy- togenes (adnátní -vrozená liste- rióza)	I. až III.trimestr	nebývají	Hepatospleno- megalie, pneu- monie, exantém, meningoencefa- litida	Meningitida, sepsse	

Tab. 4.1b. - Vybrané parazitální a bakteriální kongenitální infekce.

4.3. Kongenitální toxoplazmóza

Toxoplazmová infekce postihující ženu během gravidity nebo krátce před ní může vést k trasplacentárnímu přechodu infekce na plod. Primoinfekce proběhne u matky zpravidla asymptomaticky nebo s obrazem lehkého chřipkového onemocnění. K přenosu na plod dochází asi ve 40 % (2, HAVLÍK 2002). Rozsah poškození a četnosti přenosu závisí na řadě faktorů, jako je virulence kmene parazita, velikost infekčního inokula nebo intenzita imunitní odezvy infikované ženy a trimestr, ve kterém žena onemocněla.

V **prvním trimestru** je u neléčené toxoplazmózy riziko prenatální infekce až 15%, přičemž poškození plodu je nejzávažnější (2, HAVLÍK 2002). Množící se parazit způsobuje u plodu zánětlivou reakci s tkáňovými nekrotami, které se mohou později až kalcifikovat. Částě jsou samovolně potraty nebo se děti rodí mrtvé či s těžkým postižením.

V **dalších dvou trimestrech** těhotenství riziko přenosu infekce roste, přičemž rozsah postižení se výrazně snižuje. Ve druhém trimestru je výskyt kongenitální infekce až 54 % (5, PALIČKA 1998). Ve třetím trimestru je četnost infekce plodu cca 65 %, ale průběh onemocnění je téměř asymptomatický (2, HAVLÍK 2002). Následky se mohou projevit až v dětském nebo dorosteneckém věku, kdy se klinicky manifestují jako oční forma toxoplazmózy, hluchota, strabismus, epilepsie nebo jiné neurologické poruchy, včetně psychomotorické retardace (4, FUSKOVÁ 2003).

4.3.1. *Toxoplasma gondii*: morfologie a životní cyklus

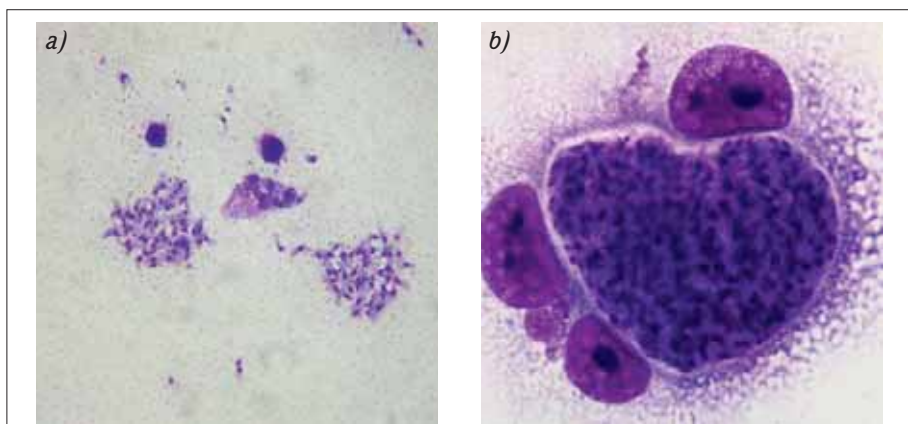
Parazitický prvok *T. gondii* byl poprvé nalezen v roce 1908 francouzskými vědci Nicollem a Manceauxem u severoafrického hlodavce *Ctenodactylus gundi*, od něhož je odvozeno druhové jméno parazita. V současnosti je prvok *T. gondii* řazen do čeledi Sarcocystidea, řádu *Eimeriida*, třídy Coccidea, kmene Apicomplexa.

T. gondii může existovat ve třech různých životních formách: jde o tzv. tachyzoity, bradyzoity a sporozoity. Tyto formy se liší svým výskytem v určitých fázích nákazy a infekčností při přenosu na dalšího hostitele.

Tachyzoity – vegetativní forma rohlíčkovitého nebo oválného tvaru o velikosti $4 - 8 \times 2 - 3 \mu\text{m}$, napadají kterýkoliv typ savčí buňky kromě bezjaderných erytrocytů ihned po primoinfekci (**obr. 4.2.a**). Rozmnožují se asexuální formou reprodukce. Masivně zaplavují hostitele, čímž aktivují tvorbu protilátek schopných brzdit další množení tachyzoitů. Tato forma je zodpovědná **za akutní fázi** onemocnění. Po aktivaci imunitního systému je parazit zatlačován do různých tkání mezihostitele a transformován na další formu - bradyzoit (7, DUBEY 2004).

Bradyzoity – klidová, pomalu se množící forma uvnitř buňky, morfologicky podobná tachyzoitům. Hostitelská buňka obsahující stovky až tisíce bradyzoitů se označuje jako tkáňová cysta, zpravidla má velikost $100 - 300 \mu\text{m}$ (**obr. 4.2.b**). Tkáňové cysty jsou schopny přežít v tkáni hostitele po celý jeho život. Jsou typické pro **latentní stádium infekce** (8, VOLF 2007)

Sporozoity (oocysty) – jsou výsledkem pohlavního množení parazita, mají kulovitou nebo lehce oválnou formu o velikosti $10-12 \mu\text{m}$. Po vyloučení z definitivního hostitele v nezralé formě dozrávají sporulací ve vnějším prostředí, a tím se stávají infekčními. Během tohoto procesu se z oocysty uvolní dvě sporocysty obsahující čtyři **sporozoity** o velikosti $2 \times 8 \mu\text{m}$ (7, DUBEY 2004).



Obr. 4.2. - *Toxoplasma gondii*, shluky tachyzoitů - převzato z <http://camelot.lfhk.cuni.cz/parazitAtlas/atlas.htm> (a); *Toxoplasma gondii*, tkáňová cysta s bradyzoity - převzato z <http://www. Roche.com/pages/facts/2/toxoplasmosis.htm> (b)

4.3.2. Toxoplazma gondii: epidemiologie a patogenese

Infekce parazitickým prvokem *T. gondii* patří poměrně k rozšířeným infekcím. V latentní formě postihuje přibližně jednu třetinu světové populace. V České republice je toxoplazmóza patrně nejčastěji se vyskytující parazitální nákazou vůbec. Výsledky sérologických vyšetření ukazují, že 30 - 40% naší populace přišlo do styku s antigeny *T. gondii* (2, HAVLÍK 2002). Nejvyšší incidence je udávána ve věku 16 - 25 let (3, DOSTÁL 2001). U zdravých imunokompetentních jedinců není toxoplazmóza velkým rizikem. Ohrožující je ale pro imunodeficientní jedince: novorozence, pacienty po orgánové transplantaci, jedince infikované virem lidské imunodeficience a onkologické pacienty. U HIV pozitivních osob je výskyt toxoplazmózy v ČR vyšší než u ostatní populace a je poměrně častou příčinou úmrtí (9, MACHALA 2007). Další rizikovou skupinou jsou gravidní ženy, u kterých může dojít k transplacentárnímu přenosu infekce na plod a způsobit vrozenou formu toxoplazmózy. Odhaduje se, že vrozená toxoplazmóza se vyskytuje u 0,1% všech novorozenců, což představuje v ČR asi 90 infikovaných dětí ročně (10, MACHALA 2005). K nákaze mezipřenositele dochází nejčastěji alimentární cestou - syrovým nebo nedostatečně tepelně zpracovaným masem, vzácně syrovým mlékem infikovaných zvířat, potravinami či vodou, kontaminovanými rukama, transplacentárně při primoinfekci matky, vzácně také transfuzí nebo transplantací orgánu od infikovaného dárce (11, GÖPERTOVÁ 2002). Šíření nákazy závisí na životních zvyklostech obyvatelstva a silně kolísá vlivem sociálních, profesních a jiných faktorů.

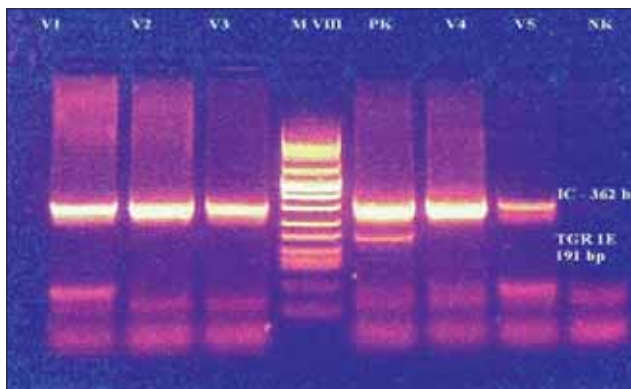
K nákaze člověka může dojít několika způsoby: **zralou oocystou**, která zkontaminovala půdu, potraviny nebo vodu nebo **tkáňovou cystou** vytvořenou v orgánech mezipřenositele. Člověk se infikuje nejčastěji pozřením nedostatečně tepelně upraveného masa obsahujícího tkáňové cysty. Dalším způsobem je transplacentární přenos na plod z matky infikované krátce před otěhotněním nebo během gravidity. Podle způsobů a doby přenosu infekce pak rozeznáváme toxoplazmózu získanou a vrozenou. V závislosti na stavu imunitního systému může toxoplazmová infekce postihnout kterýkoliv orgán (12, KOMPRDA 2000).

4.3.3. Laboratorní diagnostika toxoplazmózy

Současná diagnostika se opírá převážně o sérologická vyšetření, přímý průkaz DNA *T. gondii* pomocí PCR nebo PCR v reálném čase (rtPCR), histologickým vyšetřením nebo izolací *T. gondii* na vnímavém laboratorním zvířeti.

V současnosti se diagnostika *T. gondii* rozšířila o molekulárně biologické metody, které umožňují prokázání DNA *T. gondii* zejména u imunokompromitovaných jedinců (pacienti s AIDS, onkologičtí pacienti po imunosupresivní či cytostatické terapii, transplantovaní pacienti), gravidních žen, novorozenců, jejichž matky prodělal infekci v těhotenství, a u pacientů s významnými klinickými příznaky (15, ČERMÁKOVÁ 2004). Přímý průkaz infekčních agens pomocí molekulárních biologických metod je založen na výběru specifického úseku nukleové kyseliny mikroorganismu. Jeho přítomnost v biologickém materiálu lze považovat za průkaz příslušného mikroorganismu. Průkaz DNA *T. gondii* lze provést z poměrně širokého spektra biologického materiálu, jako je plná krev, likvor, plodová voda, kostní dřeň a další.

Diagnostika kongenitální toxoplazmózy začíná testováním matky. Pokud je sérologické vyšetření pozitivní (komplement fixační reakce, IgG avidita, IgG, IgA, IgM, IgG protilátky), odebírá se vzorek krve pro přímý průkaz DNA metodou PCR či rtPCR. Jestliže je výsledek PCR pozitivní, jde o akutní infekci matky s vysokým rizikem infekce plodu, je indikována terapie a odběr plodové vody- amniocentéza. Je-li výsledek PCR (rtPCR) pozitivní i z amniové tekutiny, je plod považován za infikovaný, s indikací následné léčby novorozence. O dalším postupu však rozhoduje ošetřující lékař na základě celkového klinického a laboratorního obrazu.



Obr. 4.3. - Detekce PCR produktů na agarózovém gelu. V1-V5: vzorky pacientů, M VIII: velikostní marker, PK: pozitivní kontrola- suspenze tachyzoitů, NK: negativní kontrola. Ve všech drahách přítomen band o velikosti 362 bp- interní kontrola izolace a amplifikace. V dráze PK přítomen band o velikosti 191 bp (cílová sekvence T.gondii). V1-V5: všechny vzorky negativní.

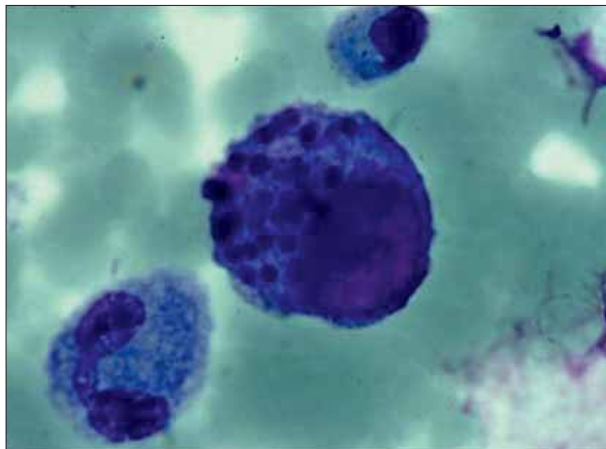
4.3.4. Prevence a terapie toxoplazmózy

Základem prevence je zabránit kontaktu člověka s oocystami nebo tkáňovými cystami. V tomto ohledu je důležitá informovanost veřejnosti o podstatě nákazy a způsobech přenosu. Zdůrazňuje se důsledné dodržování hygienických opatření při práci s půdou, dostatečná tepelná úprava masa a mléka, ochrana potravin a vody před kontaminací oocystami, při domácím chovu koček každodenní likvidace a dezinfekce jejich výkalů. Důležité je vyloučit z krmiva pro kočky syrové maso a omezit jejich přístup na dětská hřiště. V rámci prevence kongenitální nákazy je důležitý včasný sérologický screening těhotných žen. Je-li na začátku těhotenství prokázán nízký titr protilátek třídy IgG s vysokou aviditou, svědčí to o latentní infekci, a těhotnou ženu není nutné dále sledovat. V případě že protilátky nejsou prokázány, měla by žena během gravidity dodržovat zvýšená hygienická opatření a podstoupit další sérologická vyšetření. V ČR není screening na toxoplazmózu povinný (10, MACHALA 2005). Účinná očkovací látka vhodná k imunizaci lidí je zatím ve fázi výzkumu. Onemocnění toxoplazmovou infekcí podléhá v ČR povinnému hlášení (13, PROVAZNÍK 1996).

Asymptomatická a uzlinová forma toxoplazmózy u imunokompetentních jedinců nevyžaduje specifickou léčbu, infekce sama přechází do latentní formy. Léčba se zahajuje u těhotných žen a dětí s kongenitální infekcí, imunodeficientních jedinců, při oční formě toxoplazmózy a u jedinců se závažnými klinickými projevy (10, MACHALA 2005).

4.4. Cytomegalovirus: charakteristika, patogeneze, kongenitální infekce

Lidský cytomegalovirus je virovým druhem spadající do rodu *Cytomegalovirus*, podčeledi *Betaherpesviridae*, čeledi *Herpesviridae*. Tento druh si jméno vysloužil svojí schopností zvětšovat hostitelské buňky mechanismem zablokování apoptózy.



Obr. 4.4. - Lidský cytomegalovirus (převzato z *Objective source of e-learning*, www.osel.cz)

Lidský CMV navozuje latentní infekci hostitelské buňky, se schopností reaktivace infekce. CMV je největší lidský herpesvirus, perzistuje zejména v buňkách slinné žlázy, ledvinných tubulů a leukocytů. Perzistence je celoživotní, infikovaný jedinec občas vylučuje virus slinami nebo močí. Závažná je zejména aktivace infekce při imunosupresi. Zatímco je primoinfekce dospělého imunokompetentního jedince většinou lehká nebo bezpříznaková, symptomatická kongenitální infekce je závažným zdravotním problémem. Lidský cytomegalovirus je rozšířen celosvětově. Odhaduje se, že promořenost populace je cca 50 – 90 %. U dospělých imunokompetentních jedinců může dojít k onemocnění podobnému infekční mononukleóze, a to v cca 10 % případů. U osob s imunodeficitem (pacienti po transplantaci, HIV pozitivní, jedinci s vrozeným imunodeficitem, pacienti na imunosupresivní terapii) však dochází k významným zdravotním komplikacím

4.4.1. Kongenitální infekce CMV

Po zavedení plošného očkování proti rubeole se CMV stal nejzávažnějším původcem symptomatických kongenitálních infekcí (14, Roubalová 2000). Četnost u živě narozených dětí se pohybuje mezi 0,5 - 2 % (22, Bartošová 2011). Promořenost dospělé populace ve fertlím věku se u CMV pohybuje od 50 % do 80 % v závislosti na regionech. Ke kongenitální infekci plodu může dojít jak při primární, tak reaktivované infekci u matky.

V případě primární infekce, kdy specifické antivirové mechanismy nejsou ještě vvinuty, přetrvává vysoká hladina virémie po delší dobu. **CMV** replikuje v aktivovaných makrofázích a neutrofilech periferní krve. Prostřednictvím těchto buněk se infekce šíří i do placenty, kde infikuje syncytiotrofoblasty a fetální makrofágy. Ty pak zprostředkují přenos infekce do cílových orgánů plodu, které mohou být infekcí nenávratně poškozeny.

K reaktivaci CMV v průběhu těhotenství dochází až u 25 % těhotných žen. Ve většině případů se projevuje pouze vzestupem titru anamnestických protilátek a asymptomatickým vylučováním viru v cervikálním sekretu nebo v moči. Dochází k ní u hostitele, který je již imunní proti CMV, a proto je provázána pouze velmi nízkou, často neprokazatelnou viremii.

S nejvyšším rizikem poškození plodu jsou spojeny primární infekce, ke kterým dojde v průběhu prvního trimestru těhotenství (dysgeneze až ageneze *corpus callosum*, závažné poškození CNS, srdeční vady, růstová retardace plodu, rozštěp patra, spontánní potrat atp.) (16, KENNESON 2007).

4.4.2. Laboratorní diagnostika kongenitální infekce CMV

Základem pro diagnózu CMV infekce v těhotenství stále zůstává sérologické vyšetření matky. Jak však vyplývá z výše uvedených skutečností, samotný průkaz přítomnosti IgM protilátek není spolehlivým indikátorem rizika poškození plodu. IgM protilátky se mohou tvořit i při reaktivovaných infekcích, při nichž je riziko poškození plodu zanedbatelné.

Prenatální diagnostika u plodu je založena jednak na sledování jeho vývoje pomocí ultrazvuku, magnetické rezonance (MRI), v indikovaných případech se provádí kordocentéza nebo amniocentéza. Při primoinfekci v prvním trimestru a při průkazu malformací plodu je nutné zvážit ukončení těhotenství. V těchto případech je nutná spolupráce s genetiky. Dále se provádí izolace viru, další hematologické a imunologické testy, sérologicky se stanovuje specifický IgM z krve i plodové vody (15, BARTOŠOVÁ 2011).

Pro diagnostiku kongenitální infekce plodu lze využít metody prenatální diagnostiky založené na průkazu infekčního viru nebo virové DNA v amniotické tekutině pomocí metody polymerázové řetězové reakce nebo rtPCR.

Terapie pro gravidní ženy s primoinfekcí CMV není dosud standardně stanovena. Bezpečná je pravděpodobně pouze aplikace specifického hyperimunního imunoglobulinu proti CMV. Jeho podání však může pouze snížit rozsah postižení plodu, event. novorozence. Léčba antivirotiky má své vedlejší účinky (myelosuprese a nefrotoxicita).

4.4.3. Ostatní herpetické viry

Infekce vyvolané viry Herpes simplex 1 a 2

Zdrojem infekce plodu nebo novorozence je vždy gravidní žena.

Při infekci plodu během gravidity může docházet až k fatálním následkům. Vysoké riziko je hl. v I. trimestru. Kromě potratu a narození mrtvého plodu hrozí také předčasný porod, intrauterinní odumření plodu, kongenitální defekty, u živých dětí pak mikrocefalie, chorioretinitida, intralebeční kalcifikace nebo zvětšení jater a sleziny. Neurologická postižení centrální nervové soustavy mají většinou špatnou prognózu.

Perinatální infekce: Virus se může přenášet infikovanými sekrety matky při porodu, sekundárně pak aspirací do horních cest dýchacích, nebo jinými cestami. Přes pupečník se přenáší 86 – 90% infekcí novorozence (17, BARTOŠOVÁ 2010). Perinatální infekce vede k postižením kůže, očí a sliznice dutiny ústní. Další formou postižení může být encefalopatie či závažná diseminovaná multiorgánová infekce se septickými projevy a s mortalitou 70 až 80 %. U přeživších jsou popisovány následky až u 30 %. Terapie spočívá v podávání acykloviru nitrožilně (1, SEDLÁČEK 2007).



Obr. 4.5. - *Virus Herpes simplex 2* (převzato od Linda Stannard, University of Cape Town, S.A.)

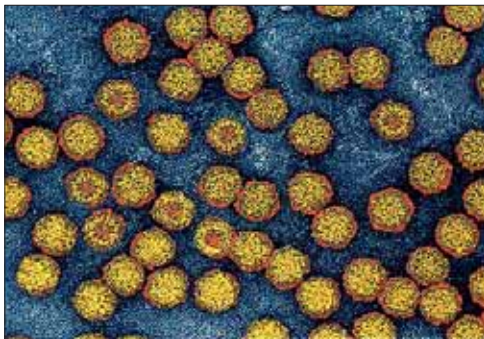
Infekce vyvolané virem Varicella-zoster

Po primární generalizované infekci, kterou je varicela, zůstává virus přítomen v organismu v latentní formě. Po reaktivaci vyvolává onemocnění herpes zoster. Významným rizikem u gravidních žen je především primoinfekce. Onemocnění v prvních 3 až 6 měsících může vést k vrozeným vývojovým vadám plodu, největší riziko je mezi 13. až 20. týdnem gravidity (17, BARTOŠOVÁ 2010).

Za Congenital Varicella Syndrome (CVS) je označována vrozená embryopatie s postižením lebky, skeletu a končetin. Přítomna jsou následně postižení CNS, kožní léze a oční komplikace. Mortalita novorozenců je až 30 % během prvních měsíců života. Při novorozenecké varicelle, kdy matka onemocní 2 - 3 týdny před porodem a která je zpravidla mírného průběhu, jsou přítomny především kožní projevy již při porodu nebo těsně po něm. Pokud však dojde k onemocnění matky v období mezi 5. dnem před a 2. dnem po porodu, může dojít ke generalizované varicelle se závažným postižením. V tomto období ještě nejsou vytvořeny mateřské protilátky v dostatečném množství a až v 35 % případů končí při neléčeném onemocnění úmrtím novorozence (1, SEDLÁČEK 2007).

4.5. Parvovirus B19: charakterisika a životní cyklus, kongenitální infekce a klinické projevy

Parvovirus B19 je malý virus s lineární jednovláknovou DNA. Z taxonomického hlediska je řazen do čeledi *Parvoviridae*, podčeledi *Parvovirinae* a rodu *Erythrovirus*. Byl objeven v roce 1975 (18, COSSART 1975). Typ B19 je jediným parvovirem, který se uplatňuje jako humánní patogen. Zpočátku byl identifikován jako etiologické agens běžného exantémového onemocnění, erythema infectiosum (pátá nemoc).



Obr. 4.6. - Parvovirus B19: barevný TEM (transmission electron micrograph) parvovirových částic (převzato z www.sciencephoto.com)

Infekce parvovirem B19 (parvoviróza) je u lidí poměrně běžnou nákazou (20, Kerr 1996). Inkubační doba se pohybuje mezi 6 – 11 dnů. PB19 je přenášen zejména respirační cestou, může ale dojít k přenosu při transfúzi krevních produktů.

Klinické projevy infekce parvovirem B19

- Imunokompetentní jedinci – akutní infekce, často asymptomatická nebo pouze s lehkými chřipkovými příznaky. Obvykle odezní i bez léčby. V některých případech dochází ke snížení množství hemoglobinu, vymizení retikulocytů, lymfopenii, neutropenii, trombocytopenii.
- Těhotné ženy – po symptomatické či asymptomatické infekci matky dochází v 8 % případů k úmrtí plodu v důsledku těžké anémie (selhání srdce, celkový otok).
- Jedinci s hematologickými poruchami (těžké hemolytické anémie + srpkovitá anémie, thalasémie, dědičná sférocytóza) - u těchto pacientů se po infekci PB19 rozvíjí tranzitorní aplastická krize (akutní ohraničená epizoda čisté aplázie erytrocytů).
- Imunokompromitovaní jedinci (akutní leukémie, vrozený imunodeficit, transplantace, imunosupresivní terapie, HIV pozitivita) – může se rozvinout perzistující infekce s chronickým poškozením erythropoézy a život ohrožující anémie. Infekce PB19 u HIV infikovaných a pacientů s AIDS není příliš běžná. Vyskytne-li se však, vede k signifikantní morbiditě. Perzistující infekce byla zaznamenána i u pacientů bez známek deficitu v imunitním systému.

4.5.1. Kongenitální infekce parvovirem B19

Jedním z projevů infekce parvovirem B19 je erythema infectiosum (tzv. pátá nemoc) (21, White 1985). Pokud tato proběhne během těhotenství, zejména ve 2. trimestru, může vést až k déletrvající supresi hemopoézy plodu- parvovirus B19 vykazuje tropismus především k progenitorovým buňkám červené krevní řady. Při lytické infekci erytroidních progenitorových buněk dochází k supresi erytropoézy. Klinické příznaky infekce vyplývají buď přímo z aplázie erytrocytární řady nebo z důsledků imunitní odpovědi hostitele. Placentomegalie je často jediným sonografickým markerem infekce, a to zejména v 1. a na počátku 2. trimestru.

Riziko poškození plodu je kolem 5 - 10 %. V nejzávažnějších případech dochází k jeho odumření nebo k hydropsu, malformace zde nevznikají (1, SEDLÁČEK 2007). Zásadní význam má u gravidní ženy s exantémem sledování vývoje plodu ultrazvukem, a to i pro léčbu hydropsu.

4.5.2. Laboratorní diagnostika infekce parvovirem B19

Diagnostické metody se zaměřují na detekci virových antigenů, nukleových kyselin a detekci specifických antivirových protilátek. Interpretace získaných výsledků je z důvodu vysoké séroprevalence poměrně komplikovaná.

Morfologické změny v kostní dřeni mohou napovědět infekci parvovirem. Typickými nálezy jsou: snížení nebo absence prekurzorů buněk červené řady, rozptýlené obrovské pronormoblasty a intracelulární inkluze v erytroidních buňkách.

Isolace viru na buněčných kulturách je možná ze vzorku séra nebo krčního stěru získaného během akutní infekce. Tato metoda je však technicky i časově náročná.

Elektronovou mikroskopii lze pro detekci viru použít. Imunoelektronová mikroskopie séra má přibližně stejnou citlivost jako antigenní detekce. Jisté obtíže přináší rozlišování viru uvnitř buněk od ribozomů, které mají obdobnou velikost.

Sérologická diagnostika je jednou z nejpoužívanějších metod (19 PETERLANA 2006). Je však vhodná pouze pro diagnostiku imunokompetentních jedinců. U imunokompromitovaných pacientů není naměřený titr protilátek adekvátní průběhu onemocnění. Diagnostika je založena na přítomnosti virově specifických IgM, IgG protilátek nebo antigenu v séru (22 MANARESI 2004). Specifické anti-B19 protilátky mohou být detekovány pomocí metody RIA (23 COHEN 1997), EIA nebo μ ELISA.

Přítomnost PB19 DNA v séru je markerem aktivní infekce, pokud je virus přítomen ve vysokých titrech. Sérum je dostupným a běžně používaným laboratorním materiálem, s možností retrospektivní analýzy. Pro kongenitální infekce se však více využívá a je vhodnější stanovení DNA PB19 z plné krve, plodové vody či kostní dřeně.

Používáními molekulárně - biologickými metodami jsou dot-blot hybridizace, in situ hybridizace, ale zejména techniky založené na PCR. Kvantitativní PCR nebo rtPCR lze provádět i monitoring aktivní infekce.

Virovou DNA lze detekovat také ve frakci mononukleárů periférní krve až šest měsíců po infekci. V aspirátech kostní dřeně je PB19 DNA detekovatelná 2 – 16 měsíců po akutní infekci a až 42 měsíců u pacientů s chronickými symptomy.

4.6. Závěr

Kongenitální infekce mohou představovat závažný zdravotní problém. Přestože incidence řady infekcí díky řadě profylaktických opatření poklesla (např. očkováním proti rubeole), přesto nelze nebezpečí z nich plynoucí podceňovat. K nejzávažnějším onemocněním patří zejména toxoplazmóza a vrozená infekce cytomegalovirem, kterým je v textu věnována velká pozornost. Děti s vrozenou infekcí jsou dispenzarizovány a dlouhodobě léčeny, kvalita jejich života může být snížena.

Komplexní péče v oblasti prevence však významně zvyšuje pravděpodobnost záchytu infekce již v počáteční fázi, moderní prostředky prenatalní diagnostiky- včetně metod laboratorních- potom mohou závčas odhalit případná poškození plodu v průběhu jeho vývoje.

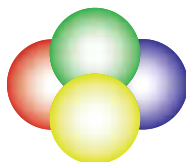
LITERATURA:

1. SEDLÁČEK D., ŠUBR I., DORT J.: Kongenitální infekce- současný stav. *Pediatric pro praxi* 2007, 2: 72-76.
2. HAVLÍK, J. ET AL.. Infekční nemoci. Galen 2002, 145-7.
3. DOSTÁL V.: Toxoplazmóza stále aktuální. *Medica Revue* 2001, 8(4): 13-16.
4. FUSKOVÁ E. ET AL.: Toxoplazmóza v dětském věku, *Pediatric pro praxi* 2003, 6: 312-13.
5. PALIČKA P., SLABÁ H., ZITEK K.: Aktivní ovlivňování výskytu kongenitální toxoplazmózy v populaci. *Praktická Gynekologie* 1998, 5(1): 23-7.
6. BARTKOVÁ M.: Využití metod molekulární biologie pro detekci Toxoplazma gondii. Bakalářská práce. LF MÚ Brno 2009.
7. DUBEY J. P.: Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology* 2004, 122: 57-72.
8. VOLF P., HORÁK P.: Paraziti a jejich biologie. Triton, 2007, 103-105.
9. Machala L., Kodym P.: Doporučený postup diagnostiky a terapie toxoplazmózy u osob s HIV infekcí. *Klin Mikrobiol Inf Léč* 2007, 13(6): 248-252.
10. MACHALA L., KODYM P., ČERNÝ R.: Toxoplazmóza. *Interní medicína pro praxi* 2005, 3: 120-122.
11. GÖPERTOVÁ M. ET AL.: Epidemiologie infekčních nemocí. *Karolinum* 2002: 118-120.
12. KOMPRDA T.: Obecná hygiena potravin. *MZU Brno* 2000: 117-118.
13. PROVAZNÍK K., KOMÁREK L., KRÍŽ B.: Manuál prevence v lékařské praxi: IV. Základy prevence infekčních onemocnění. *Fortuna* 1996: 113-115.
14. ROUBALOVÁ K., SUCHÁNKOVÁ A.: Kongenitální a perinatální infekce způsobené herpetickými viry. *Moderní gynekologie a porodnictví* 2000, 9(2) Supplementum.
15. BARTOŠOVÁ D.: Kongenitální cytomegalovirová infekce: diagnostika a terapie. *Pediatric pro praxi* 2011, 12(1): 16-17.
16. KENNESON A., CANNON J.N.: Review and meta analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 2007, 17: 253-276.
17. BARTOŠOVÁ D.: Prevence a terapie herpesvirových kongenitálních infekcí u novorozenců. *Pediatric pro praxi* 2010, 11(2): 129-131.
18. COSSARTY.E., FIELD A.M., CANT B., WIDDOWS D.: Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1975, 1:72-73.

19. PETERLANA D. ET AL.: Serologic and molecular detection of human Parvovirus B19 infection. *Clin Chim Acta* 2006, 372: 14-23.
20. KERR J.R.: Parvovirus B19 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996, 5: 10–29.
21. WHITE D.G. ET AL.: Human parvovirus arthropathy. *Lancet* 1985, 1: 419–421.
22. MANARESI E., GALLINELLA G., VENTUROLI S., ZERBINI M., MUSIANI M.: Detection of Parvovirus B19 IgG: choice of antigens and serological tests. *J Clin Virol* 2004, 29: 51–53.
23. COHEN B.J.: Detection of Parvovirus B19-specific IgM by antibody capture radioimmunoassay. *J Virol Methods* 1997, 66: 1–4.

6. téma

Prenatální a perinatální laboratorní diagnostika



5. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA

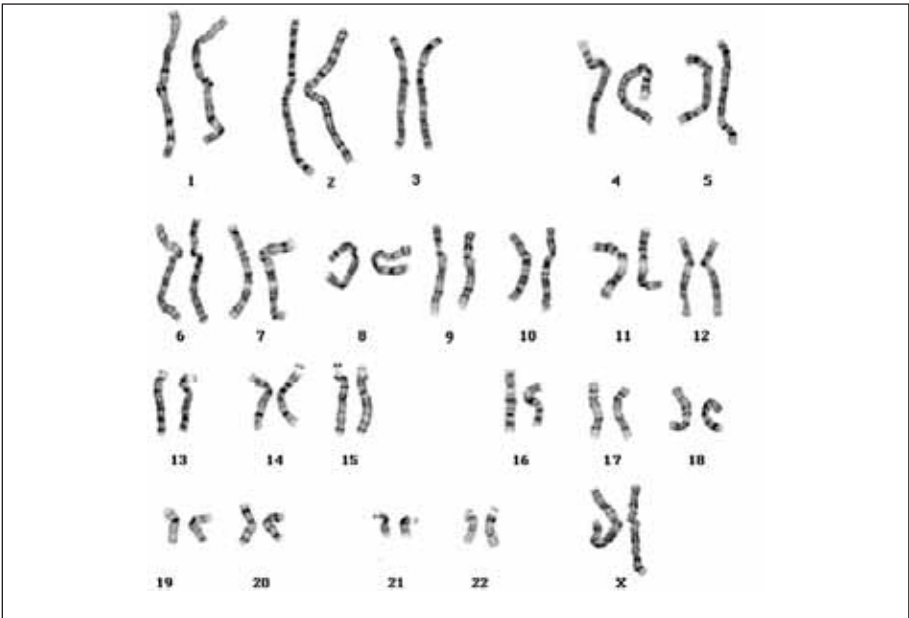
Obrázky pochází z diagnostických laboratoří
Oddělení lékařské genetiky a fetální medicíny FN v Olomouc



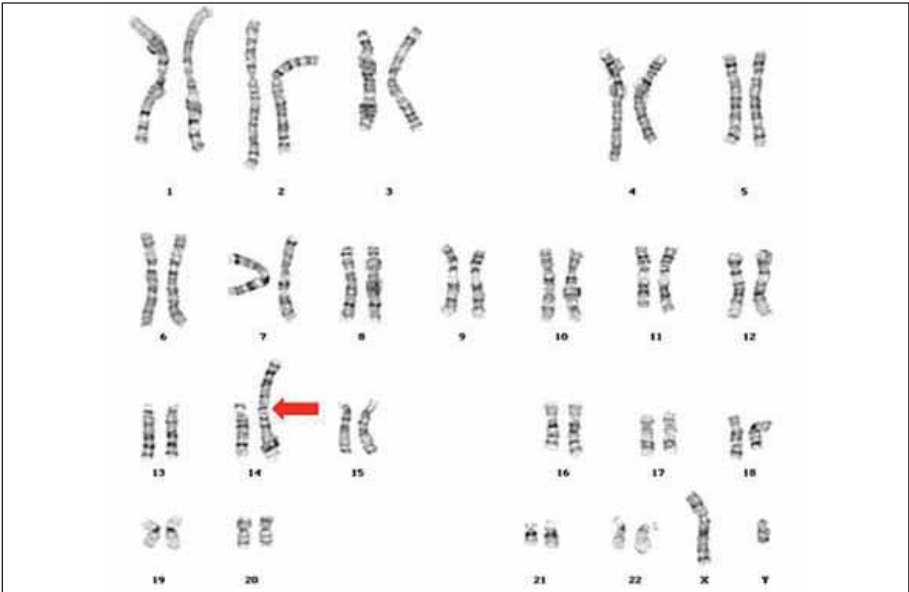
OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ
Integrace vědy, výzkumu, odborného vzdělávání a praxe



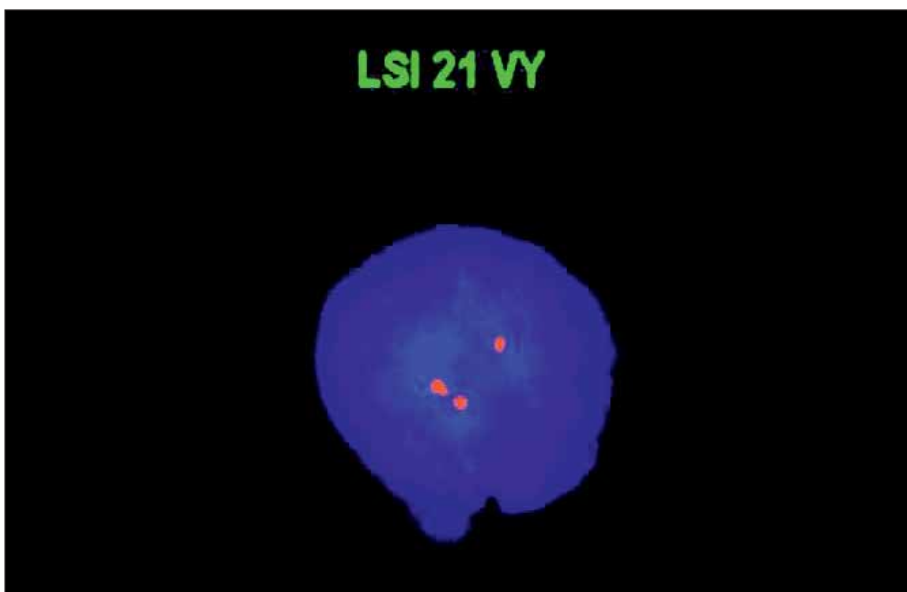
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



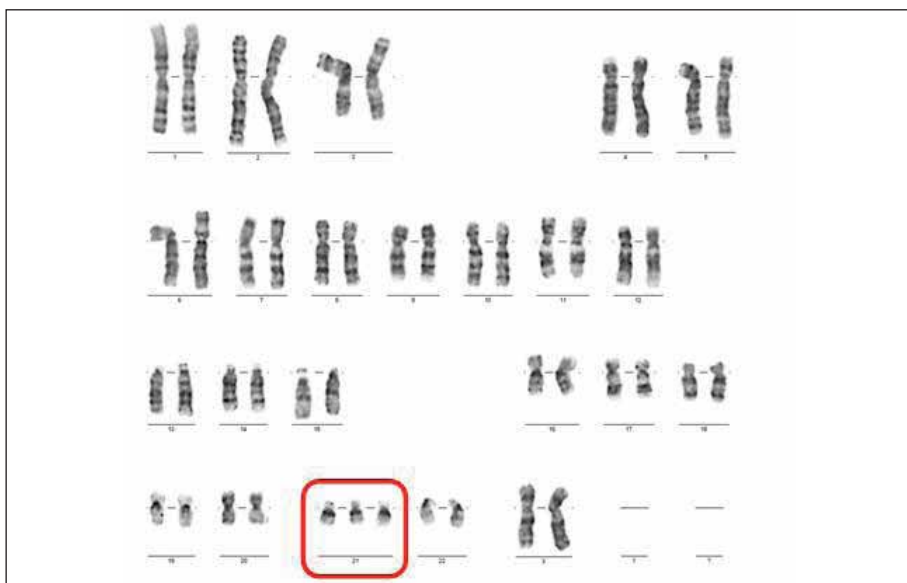
Obr. 5.1. - Karyotyp lidské somatické buňky – fyziologický ženský (46,XX)



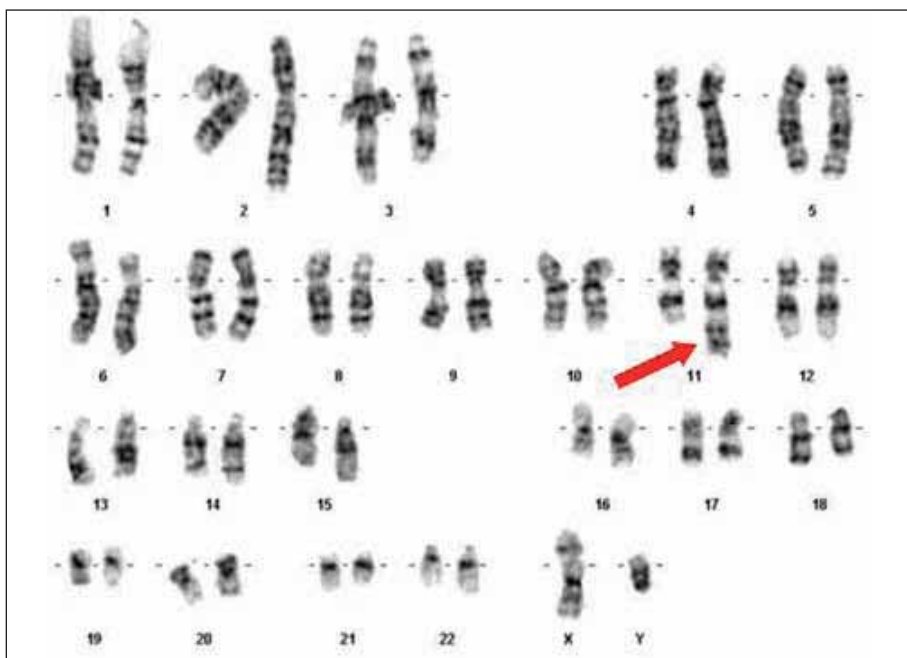
Obr. 5.2. - Trisomie 13 v translokované formě, důsledek Robertsonská translokace (13;14). Detekce volné trisomie chromosomu 21 (Downův syndrom).



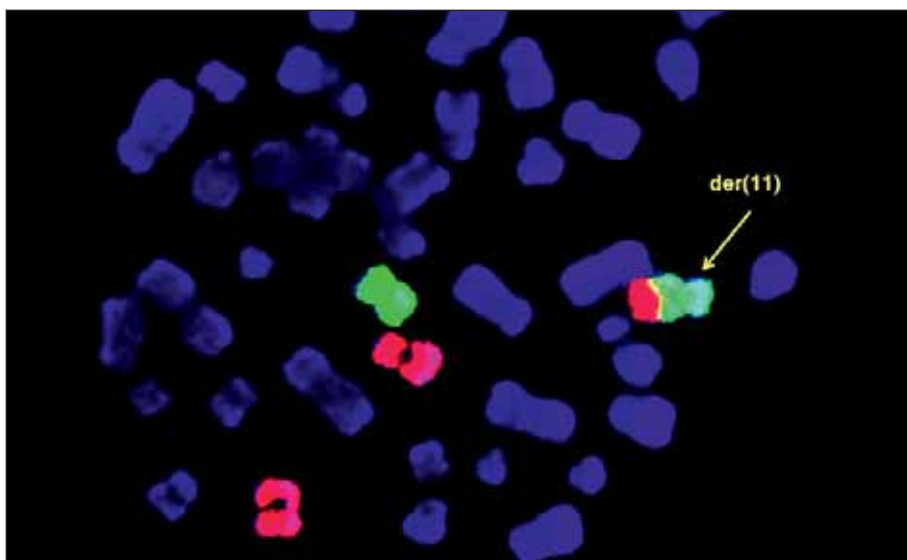
Obr. 5.3. - Ukázka interfázní FISH na nekultivovaných amniocytech



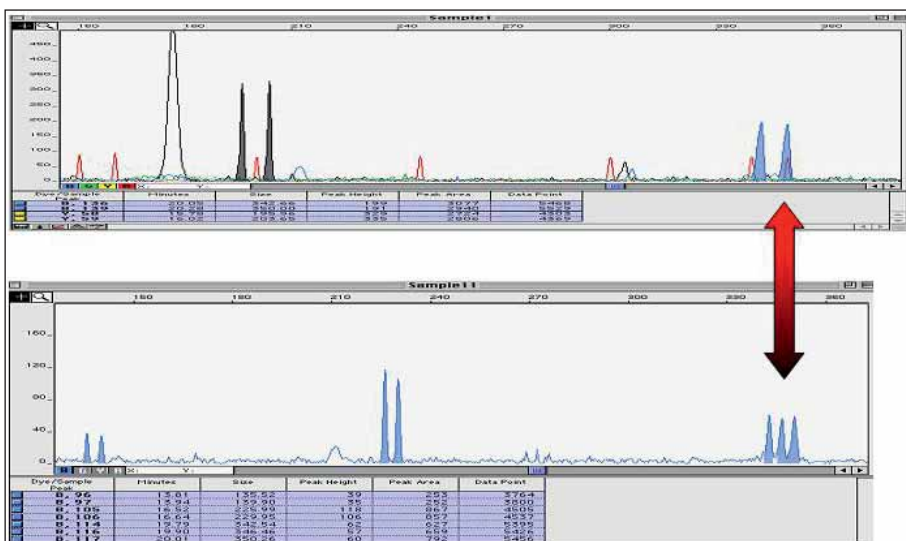
Obr. 5.4. - Následný karyogram získaný z G- pruhovaných kultivovaných fibroblastů potvrdil chromosomální aneuploidii detekovanou FISH. Ukázka patologického nálezu v karyotypu a dovyšetření metodou FISH.



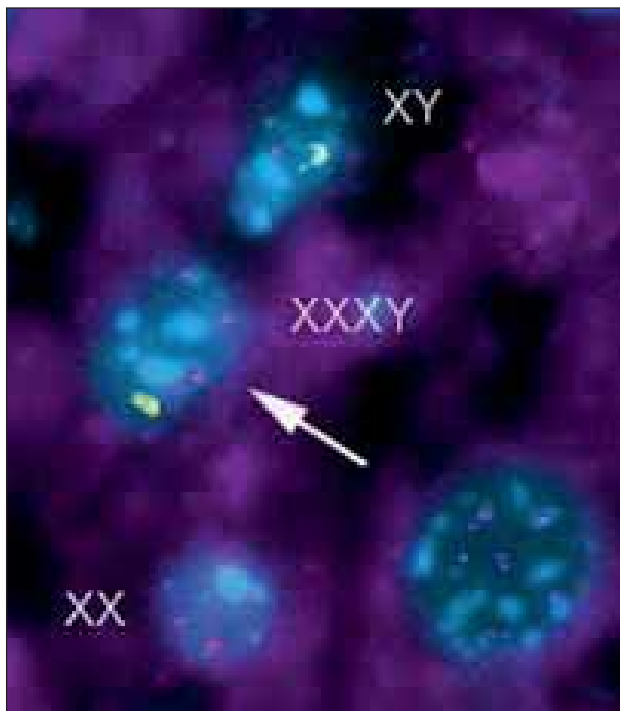
Obr. 5.5. - Karyotyp probanda se strukturální CHA derivovaným chromosomem 11



Obr. 5.6. - FISH s malovacími sondami pro chromosomy 9 a 11 odhalila, že derivovaný materiál na chromosomu 11 pochází z chromosomu 9



Obr. 5.7. - QF PCR - srovnání fyziologického nálezu s volnou trisomií chromosomu 21 v lokusu D21S1414



Obr. 5.8. - Detekce gonosomů XXXY u blastomery metodou FISH (X-fialově, Y-žlutě); zdroj http://www.chromoscience.jp/p_probe/windowP02e.html

Ing. Dalibor Novotný, Ph.D.
Doc. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.
RNDr. Kateřina Adamová, Ph.D.
Mgr. Lucie Roubalová
RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D.

Prenatální a perinatální laboratorní diagnostika

Výkonný redaktor: Prof. RNDr. Tomáš Opatrný, Dr.
Odborný redaktor: RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D.
Odpovědná redaktorka: Mgr. Jana Kreiselová
Technický redaktor: Books print s.r.o., I.P.Pavlova 69, Olomouc 772 00,
www.booksprint.cz

Návrh obálky: Vlastislav Bič

Publikace je určena jako vzdělávací materiál pro účastníky projektu Od fyziologie k medicíně – integrace vědy, výzkumu odborného vzdělávání a praxe (CZ.1.07/2.3.00/09.0219)

© Univerzita Palackého v Olomouci, 2011
Křížkovského 8, 771 47 Olomouc
www.upol.cz/vup
e-mail: vup@upol.cz
Olomouc 2011

Neoprávněné užití tohoto díla je porušením autorských práv a může zakládat občanskoprávní, popř. trestněprávní odpovědnost.

Tato publikace neprošla redakční jazykovou úpravou.

© Dalibor Novotný, Tomáš Adam, Kateřina Adamová, Lucie Roubalová, Ivana Fellnerová 2011

1. vydání

ISBN 978-80-244-2913-7

Neprodejné

Katedra zoologie, Přírodovědecká
fakulta UP Olomouc



Oddělení klinické biochemie FN OL

Oddělení lékařské genetiky
a fetální medicíny FN OL



VYDALA UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI 2011
ISBN 978-80-244-2913-7