

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

“CAROL DAVILA” BUCUREȘTI

TEZĂ DE DOCTORAT

DIAGNOSTICUL GENETIC PRENATAL

PRIN BIOPSIE DE TROFOBLAST

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC

PROFESOR DR. EMILIA SEVERIN

DOCTORAND

DR. MIHAI DUMITRESCU

București

2016

1

CUPRINS SELECTIV AL TEZEI DE DOCTORAT

MOTIVAȚIA ȘTIINȚIFICĂ ȘI PROFESIONALĂ A STUDIULUI DOCTORAL	13
SCOPUL STUDIULUI ȘI OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT	15
1 INTRODUCERE	17
FUNDAMENTAREA ȘTIINȚIFICĂ	19
2 DIAGNOSTICUL GENETIC PRENATAL	20
3 DIAGNOSTICUL GENETIC PRENATAL AL ANOMALIILOR CROMOZOMIALE	27
4 ANOMALII CROMOZOMIALE	33
4.1 INCIDENȚA ANOMALIILOR CROMOZOMIALE	33
4.2 CLASIFICAREA ANOMALIILOR CROMOZOMIALE	35
4.3 TEHNICI DE ANALIZĂ CROMOZOMIALĂ	40
5 TEHNICILE INVAZIVE DE DIAGNOSTIC	47
5.1 BIOPSIA DE VILOZITĂȚI CORIALE (CVS)	47
5.2 AMNIOCENTEZA	56
5.3 CORDOCENTEZA (PUBS)	60
6 PREZENTAREA LOTULUI STUDIAT	63
7 REZULTATELE STUDIULUI	77
8 CAZURI CLINICE	87
9 DISCUȚII	132
10 CONCLUZII	145
ELEMENTE DE NOUȚATE ALE STUDIULUI	147
BIBLIOGRAFIE	148
Anexa	160
ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ ÎN TIMPUL PREGĂTIRII DOCTORALE	160

MOTIVAȚIA ȘTIINȚIFICĂ ȘI PROFESIONALĂ A STUDIULUI DOCTORAL

Anomaliile cromozomiale sunt un eveniment relativ frecvent observat la specia umană. Estimările epidemiologice arată că 35-40% dintre avorturile spontane, 10% dintre nou-născuții morți și 1% dintre nou-născuții vii sunt cauzate de anomalii cromozomiale neechilibrate. În România s-a estimat că se nasc anual 2500-3000 copii cu handicap grav din care 1000-1200 sunt cu malformații cardiovasculare grave cu impact social și familial major, în timp ce anomaliile fetale cauzează 20-30% din mortalitatea infantilă, ocupând locul 2 după prematuritate

Nu există încă un studiu complex adaptat realității socio-economice și populației din România centrat pe diagnosticul prenatal și procedurile invazive utilizate.

În cercetarea de față am dorit să fac o analiză statistică a loturilor de paciente investigate în cadrul Spitalului Clinic de Obstetrică și Ginecologie "Prof. Dr. Panait Sârbu" în perioada 2012-2015 pentru a stabili incidența complicațiilor după procedurile invazive de diagnostic prenatal și a principalelor anomalii cromozomiale întâlnite în sarcină.

În urma realizării acestui studiu a fost posibilă identificarea pacientelor cu risc genetic, stabilirea tipului de procedură diagnostică funcție de vârsta sarcinii, a complicațiilor post-procedurale și a tipurilor de aneuploidii fetale întâlnite, urmate de precizarea conduitei terapeutice.

Lucrarea de față prezintă interes pentru practica medicală fiind primul studiu efectuat în România în acest sens și aduce date noi referitor la utilitatea procedurilor de diagnostic prenatal în populația investigată. Partea specială este direcționată spre furnizarea de informații noi pentru îmbunătățirea programului național de sănătate "Strategia Națională de Sănătate 2014 – 2020":

SCOPUL STUDIULUI ȘI OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT

Actualitatea domeniului anomaliilor fetale pentru sănătatea publică și cercetare științifică medicală este reflectată în activitatea de cercetare științifică ce se desfășoară în ritm alert pe plan mondial în structuri organizate ale căror rezultate sunt valorificate în lucrări publicate periodic.

Scopul studiului a fost creșterea calității serviciilor medicale oferite femeii gravide prin îmbunătățirea metodelor de diagnostic prenatal a anomaliilor cromozomiale.

Obiectivul științific general urmărește îmbunătățirea predicției și prevenției în populația României a anomaliilor fetale prin demonstrarea influenței diagnosticului prenatal în reducerea anomaliilor congenitale și îmbunătățirea performanței actuale a screening-ului precoce pentru anomalii fetale

Obiectivele științifice specifice pe care le-am urmărit sunt:

1. Identificarea prin screening biochimic și ecografic a sarcinilor cu risc malformativ și a semnelor precoce care indică diagnosticul citogenetic prenatal;
2. Prevenția anomaliilor fetale prin diagnostic genetic prenatal (Biopsie de trofoblast și Amniocenteză);
3. Evidențierea contribuției diagnosticului prenatal în reducerea frecvenței anomaliilor congenitale majore;
4. Îmbunătățirea performanței screening-ului de trimestrul I în detecția anomaliilor fetale;
4. Compararea rezultatelor studiului cu datele disponibile în literatură de specialitate;
5. Respectarea principiilor fundamentale ale eticii cercetării medicale;
6. Valorificarea rezultatelor cercetării în lucrări științifice publicate și comunicate.

1 INTRODUCERE

Descoperirea tehnicilor de analiză cromozomială a dus la identificarea defectelor la nivel cromozomial în cazul multor boli. Astfel au fost stabilite cauzele sindroamelor Down, Klinefelter sau Turner, au fost recunoscute multiple trisomii autosomale și au fost decelate sindroamele plurimalformative asociate cu defecte cromozomiale în total fiind identificate aproximativ 1000 de sindroame cromozomiale.

Anomaliile cromozomiale sunt responsabile pentru un număr considerabil de avorturi spontane, malformații congenitale, și retard mental. De asemenea, contribuie la apariția unei proporții semnificative de malignități, atât la copil cât și la vârsta adultă, ca o consecință a malformațiilor somatice dobândite. Deși multe dintre aceste sindroame cromozomiale sunt rare, ele reprezintă o sursă de morbiditate și mortalitate.

În prezent se folosește diagnosticul prenatal, care poate detecta anomalii prezente în viața intrauterină. Astfel diagnosticul prenatal este o opțiune aleasă de multe cupluri cu risc ridicat de a avea un copil cu boală ereditară severă, deși nu este ușor pentru un cuplu de a se hotărî la o asemenea procedură de diagnostic, datorită posibilității unui rezultat care să aducă în discuție o eventuală întrerupere de sarcină.

2 DIAGNOSTICUL GENETIC PRENATAL

Medicina modernă presupune aplicarea următoarelor principii în practica medicală: predicție, prevenție, personalizare și participare. Predicția (anticiparea) are la bază cunoașterea profilului genetic și a factorilor de risc ai pacientului, informații care, prelucrate cu ajutorul unor modele matematice pot preciza bolile la care este predispus pacientul oferind medicului posibilitatea de a aplica măsuri de *prevenție*.

2.1 DEFINIȚIE

Diagnosticul prenatal (DPN) este un act medical complex, înalt informativ, care permite depistarea a numeroase anomalii congenitale și boli genetice în cursul vieții fetale. Acest serviciu medical este realizat corect numai printr-o strânsă colaborare multidisciplinară, în care medicul genetician are un rol esențial în evaluare, diagnostic și sfat genetic. (Covic, Stefanescu, & Sandovici, 2011).

2.2 ISTORIC

Amniocenteza a început să fie utilizată pe scară largă abia din 1970 când Nadler și Gerbie au publicat în New England Journal of Medicine articolul intitulat "Rolul amniocentezei în diagnosticul intrauterin al defectelor genetice" care prezenta avantajele tehnicii în diagnosticarea bolilor legate de cromozomul X, a anomaliilor cromozomiale și a defectelor de tub neural.

Tehnică actuală de puncție ghidată ecografic a fost introdusă de Jens în 1972 și s-a bazat pe studiile efectuate de Vidoson, Hoffman și Hollander în 1967 cu privire la avantajele imagisticii intervenționale.

2.3 TEHNICI CURENTE DE DIAGNOSTIC PRENATAL INVAZIV / NON- INVAZIV

Ecografia fetală (2D/3D/4D) rămâne cea mai uzitată metodă de screening a malformațiilor fetale datorită disponibilității și lipsei de efecte secundare post expunere comparativ cu RMN-ul sau radiografia fetală.

Fetografia - cândva de utilitate în diagnosticarea deficitului de creștere intrauterină prin măsurarea femurului, tibiei și a humerusului în trimestrul 3 de sarcină (săptămânile 37-40), radiografia fetală, sau fetografia, a fost înlocuită cu ecografia fetală datorită complicațiilor

rezultate în urma expunerii la radiații precum decesul intrauterin, teratogenicitate și riscul crescut de malignitate în copilărie (1:1700 cazuri cu doză 10mGy) (Covic et al., 2011).

Fetoscopia presupune vizualizarea fătului cu ajutorul unui dispozitiv flexibil cu fibra optică (fetoscop), introdus transabdominal, în vederea identificării unor posibile defecte congenitale și prelevării de țesut fetal (piele și mușchi) pentru diagnostic genetic.

Diagnosticul genetic preimplantatoriu (PGD) a fost introdus de Handyside în 1990 ca o alternativă la diagnosticul genetic prin tehnici invazive și presupune testarea genetică a embrionilor, după concepția prin fertilizare in vitro.

Biopsia de vilozități coriale (CVS - chorionic villus sampling) se efectuează în intervalul 10 - 12 săptămâni de gestație pe cale transvaginală sau transabdominală.

Amniocenteza este procedura de recoltare a lichidului amniotic și se efectuează în trimestrul II de sarcină, începând cu săptămâna 15 de sarcină.

Cordocenteza este procedura de recoltare a sângelui fetal după 20 de săptămâni de sarcină. (Weiner C.P., 2006).

2.4 INDICAȚIILE DIAGNOSTICULUI PRENATAL

Conform protocoalelor de diagnostic prenatal o pacientă trebuie să prezinte risc de malformații sau anomalii fetale care să depășească riscul de avort postprocedural înainte de a efectua amniocenteză sau biopsie de vilozități coriale.

2.5 AVANTAJELE / DEZAVANTAJELE DIAGNOSTICULUI PRENATAL INVAZIV / NON-INVAZIV

În proporție de peste 90% din cazurile testate pentru risc genetic, rezultatele exclud existența unui sindrom genetic astfel principalul avantaj al diagnosticului genetic prenatal pentru

cuplu este unul psihologic și anume siguranța că viitorul lor copil este sănătos (Covic et al., 2011).

3 DIAGNOSTICUL GENETIC PRENATAL AL ANOMALIILOR CROMOZOMIALE

Anomaliile citogenetice au oferit primele indicații privind rolul potențial al cromozomilor în producerea avorturilor spontane și a malformațiilor congenitale. În vederea detectării/identificării anomaliilor cromozomiale se impune cunoașterea structurii și funcțiilor normale a cromozomilor umani, ceea ce permite un studiu comparativ.

Cromozomul este o structură filamentoasă, condensată, formată din ADN înfășurat în jurul miezului histonic și asociat cu proteine non-histonice (cromatina nucleară condensată) vizibilă microscopic în nucleu, în cursul diviziunii celulare. Altfel spus, cromozomul este expresia unei ordini de organizare elevate a cromatinei nucleare în timpul diviziunii celulare, mitoză sau meioză.

4 ANOMALII CROMOZOMIALE

4.1 INCIDENȚA ANOMALIILOR CROMOZOMIALE

La minim 10% dintre spermatozoizi și la minim 25% dintre ovocitele mature sunt prezente anomalii cromozomiale. 15-20% dintre sarcinile recunoscute se soldează cu avorturi spontane (Steer, Campbell, Davies, Mason, & Collins, 1989), iar anomaliile genetice reprezintă cea mai frecventă cauză.

Anomaliile cromozomiale de număr presupun pierderea sau câștigul unuia sau mai multor cromozomi.

Anomaliile cromozomiale structurale - rearanjările structurale cromozomiale se produc prin fragmentări ale cromozomilor, urmate de reasamblări în configurații diferite, și pot fi echilibrate sau neechilibrate.

În **Disomia uniparentală (DUP)** ambii cromozomi ai unei perechi au fost moșteniți de la un singur părinte. Cauza cea mai frecventă (aprox. 30%) este pierderea unui cromozom de către un zigot care inițial a prezentat trisomie și care a rezultat în urma unei non-disjuncții meiotice. (Kotzot, 1999).

Amprentarea genomică - în condiții normale acțiunea oricărei gene este independentă de originea paternă sau maternă însă există și gene cu expresie diferită în funcție de părintele de la care a fost moștenită, iar acest fenomen se numește amprentare genomică.

Defectele mitochondriale - mitocondria este o structură moștenită exclusiv pe linie maternă, prin citoplasmă ovulului, și este centrul metabolismului energetic al celulei.

4.2 TEHNICI DE ANALIZĂ CROMOZOMIALĂ

4.2.1 TEHNICI DE CITOGENETICĂ CLASICĂ (CONVENȚIONALĂ)

Testele de diagnostic prenatal implica analiza materialului biologic fetal obținut prin proceduri invazive de recoltare: biopsie de vilozități coriale, amniocenteza sau cordocenteza.

Cariotipul fetal este utilizat pentru detecția anomaliilor cromozomiale numerice și structurale de tipul deleției, inserției, duplicației, inversiei și translocării, prin tehnici de bandare.

Mozaicismul este o anomalie cromozomială numerică și descrie un individ care are două sau mai multe linii celulare diferite cromozomial originând dintr-un singur zigot.

Himerismul este definit ca prezența la nivelul unui individ a două sau mai multe linii celulare, derivate din zigoți diferiți, ce pot avea ca rezultat prezența a două tipuri de grupe sanguine, organe genitale masculine și feminine, etc (Aaron & Zehner, 2008).

4.2.2 TEHNICI DE CITOGENETICĂ MOLECULARĂ

Hibridizarea in situ cu fluorescență (FISH) se bazează pe capacitatea unui fragment de ADN monocatenar de aprox. 40kb de a recunoaște și a se fixa la secvența complementară de ADN de pe un cromozom aflat în metafază.

Hibridizarea genomică comparativă (CGH) este o colorare inversă modificată introdusă de Kallioniemi (Kallioniemi et al., 1992), folosită în genetica oncologică, pentru a detecta regiuni de pierdere alelică și de amplificare genică.

QF-PCR (Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction - PCR cantitativ fluorescent) a fost introdusă în 1993 de către Mansfield pentru detectia aneuploidiilor cromozomilor 13, 18, 21, X și Y. QF-PCR este o variantă a tehnicii PCR în care sunt utilizați primeri fluorescenți pentru a se determina cantitativ dozajul alelic al fiecărui marker prin electroforeză capilară.

Tehnica MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) este o metodă citogenetică moleculară care utilizează sonde monocatenare specifice pentru a determina numărul de copii ale acestora printr-o singură reacție de polimerizare în lanț și utilizând un singur set de primeri.

Spectrometrie de masă MALDI-TOF (matrix-associated laser desorption / ionization time-of-flight) permite detecția diferențelor de masă de o singură nucleotida și este utilizată în testarea probelor de lichid amniotic și vilozități coriale pentru polimorfism cromozomial, dar s-a dovedit utilă și în detecția prenatală a Sindromului Down (Stan, 2013).

Diagnosticul molecular - reacția de polimerizare în lanț permite amplificarea secvențelor ADN sau a genelor, indiferent de dimensiuni, prin mecanisme de replicare, obținându-se *in vitro* un număr crescut de copii.

Citometria de flux - datorită mărimii și compoziției diferite, cromozomii fixează cantități diferite de coloranți fluorescenți, dintre care unii se leagă specific la secvențe GC (bogate în gene), iar alții la secvențe AT (relativ sărace în gene).

5 TEHNICILE INVAZIVE DE DIAGNOSTIC

Lucrarea de față își propune să facă o comparație între procedura de diagnostic prenatal Biopsie de Vilozități Coriale (recoltarea de material placentar prin puncție sub ghidaj ecografic) și procedura considerată a fi standardul de aur al diagnosticului prenatal, Amniocenteza (recoltarea de lichid amniotic de la nivelul sacului amniotic). Pentru aceasta am făcut referire la date din literatura internațională privind procedurile și testele de diagnostic prenatal și în paralel am urmărit corelarea lor cu rezultatele obținute în practică, la „Clinica de Obstetrică-Ginecologie Prof. Dr. Panait Sârbu” .

5.1 BIOPSIA DE VILOZITĂȚI CORIALE (CVS)

5.1.1 SCOPUL INTERVENȚIEI SI MATERIALUL NECESAR

Biopsia de trofoblast, sau vilozitati coriale (CVS), este o procedură sigură și eficientă ce permite stabilirea diagnosticului genetic prenatal încă din primul trimestru de sarcină prin prelevarea de material biopstic de la nivelul placentei, înainte de efectuarea vreunui test de screening prenatal, și cariotiparea prin metoda de vizualizare directă în primele 72 ore de la efectuarea procedurii (Covic et al., 2011).

5.1.2 PRINCIPIUL METODEI

Biopsia de Vilozități Coriale este o procedură invazivă ce poate fi efectuată și în Ambulatoriul de specialitate, însă pentru confortul psihic al pacientei cât și pentru transparența actului medical în sine, ideal este efectuarea acestei proceduri în cadrul unei unități spitalicești cu experiență în efectuarea intervențiilor de diagnostic prenatal.

5.1.3 TEHNICA DE LUCRU

Preoperator este important controlul ecografic transabdominal pentru aprecierea grosimii placentare și inserției acesteia în vederea stabilirii situsului de puncție. Inserția anterioară a placentei este preferabilă reducând riscul de lezare a fătului în timpul manevrei. Sub control ecografic, cu ajutorul unui ac de puncție cu mandren și grosime recomandată de 16-18G introdus transabdominal, se recoltează prin aspirație fragmente de citotrofoblast (vilozități coriale) în seringi de 20ml ce conțin mediu de transport.

5.1.4 TEHNICA DE LABORATOR

Materialul recoltat prin puncție conține elemente variate – fibroblaști, celule endoteliale, macrofage și matrice intercelulară. Fibroblaștii de la nivelul vilozităților coriale au capacitate înalt proliferativă in vitro și sunt ideale pentru stabilirea diagnosticului citogenetic.

5.1.5 UTILITATEA METODEI

Biopsia de Vilozități Coriale se efectuează în săptămânile 10-12 de sarcină și permite prelevarea de material bioptic de la nivelul placentei pentru a fi folosit în studierea profilului ADN al fătului cât și pentru efectuarea diferitelor teste biochimice utile în determinarea posibilelor modificări genice și cromozomiale. .

5.2 AMNIOCENTEZA

5.2.1 SCOPUL INTERVENȚIEI SI MATERIALUL NECESAR

Această intervenție de diagnostic prenatal reprezintă prelevarea de lichid amniotic de la nivelul sacului amniotic, prin puncție transabdominală, sub ghidaj ecografic continuu între săptămânile 14-25 de sarcină (optim între săptămânile 15-17 și precoce începând cu săptămâna 12), cu ajutorul unui kit de puncție dedicat. Lichidul este ulterior analizat în vederea detecției anomaliilor comozomiale și a mutațiilor genice (Covic et al., 2011).

5.2.2 PRINCIPIUL METODEI

Principalele indicații pentru care este practică această procedură sunt:

- Vârsta maternă înaintată (peste 35 de ani);
- Avorturi spontane repetate de etiologie neprecizată;
- Sarcină anterioară cu făt ce a prezentat anomalii cromozomiale;
- Sarcină anterioară cu făt ce a prezentat malformații congenitale deschise de tub neural (anencefalie, spina bifida);
- Determinarea Rh-ului fetal la o mamă Rh negativă;
- Identificarea cauzelor de oligohidramnios;
- Sarcină anterioară cu făt ce a prezentat diferite dismetabolii ereditare.
-

5.2.3 METODA DE LUCRU

Preoperator este important controlul ecografic transabdominal pentru identificarea sacului amniotic și măsurarea AFI în vederea stabilirii situsului de puncție. Valorile scăzute ale AFI sugestive pentru oligohidramnios reprezintă o contraindicație relativă.

5.3 CORDOCENTEZA (PUBS)

5.3.1 SCOPUL INTERVENTIEI SI MATERIALUL NECESAR

Această metoda de diagnostic prenatal consta prelevarea de sânge fetal de la nivelul cordonului ombilical, sub ghidaj ecografic continuu, după săptămâna 19 de sarcină (perioada optimă), cu ajutorul kit-ului de puncție.

5.3.2 PRINCIPIUL METODEI

Principalele indicații pentru care este practicata aceasta procedura sunt:

- Vârsta maternă înaintată (peste 35 de ani);
- Avorturi spontane repetate de etiologie neprecizată;
- Sarcină anterioară cu făt ce a prezentat anomalii cromozomiale;
- Sarcină anterioară cu făt ce a prezentat diferite dismetabolii ereditare.

5.3.3 METODA DE LUCRU

Preoperator este important controlul ecografic transabdominal pentru identificarea cordonului ombilical și studierea fluxului sanguin în modul Doppler în vederea stabilirii situsului de puncție. Sub control ecografic, cu ajutorul unui ac de puncție cu mandren și grosime recomandată de 21-23G introdus transabdominal paraombilical, se străpunge învelisul sacului amniotic și se recoltează de la nivelul cordonului ombilical (vena ombilicală) prin aspirație sânge fetal în seringi de 20ml ce conțin mediu de transport.

6 PREZENTAREA LOTULUI STUDIAT

Intervențiile au fost efectuate în cadrul Spitalului Clinic de Obstetrică-Ginecologie „Prof. Dr. Panait Sarbu” în perioada 1 Ianuarie 2013 – 31 Decembrie 2015.

Protocolul investigator a presupus efectuarea în primă fază a unei analize genetice rapide cu scop de detectare a anomaliilor cromozomiale pe cromozomii 13, 18, 21, X și Y. Analiza aleasă a fost QF-PCR datorită posibilității de obținere a unui rezultat parțial în mai puțin de 24 ore și detecției contaminării probelor cu ADN matern (Langlois & Duncan, 2011; Saadi, Kushtagi, Gopinath, & Satyamoorthy, 2010). Verificarea rezultatul rapid al QF-PCR s-a făcut prin analiza Cariotipului (Cariograma) obținut în termen de 10-14 zile de la recoltare.

6.1 CRITERII DE INCLUDERE ȘI EXCLUDERE

În acest studiu descriptive au fost înrolate 358 paciente de cetățenie și naționalitate Română cu vârste cuprinse între 18 și 42 ani care au optat pentru o procedura de diagnostic genetic prenatal în baza riscului genetic crescut prin unul sau mai mulți factori. În grupul Amniocenteză au fost repartizate 323 paciente cu vârsta sarcinii de peste 14 săptămâni și 0 zile. În grupul Biopsie de Viloziță Coriale au fost repartizate 36 paciente cu vârsta sarcinii cuprinsă între 11 săptămâni, 0 zile și 13 săptămâni, 7 zile.

6.2 CRITERII DE ADRESABILITATE

Motivele care au stat la baza prezentării acestor paciente cu scopul de a efectua o intervenție de diagnostic prenatal au fost reprezentate de:

- rezultate pozitive ale testelor de screening biochimic;
- la recomandarea medicului genetician sau a medicului currant obstetrician, ca o consecință a vârstei înaintate >35 ani;

- existența în antecedente personale patologice sau heredo-colaterale a unor afecțiuni genetice (cariotip parental modificat, sarcini patologice, rude cu sindroame genetice);
- la recomandarea medicului obstetrician ca o consecință a unui examen ecografic patologic (pliu nucal mărit, oligohidramnios, despicătură labiopalatină, defect de tub neural).

6.3 DISTRIBUȚIA TERITORIALĂ A PACIENTELOR

În grupul CVS o singură pacientă a provenit din mediul rural, în timp ce în grupul Amniocenteză, din 323 de paciente, 42 paciente (13%) au provenit din mediul rural.

6.4 DISTRIBUȚIA PACIENTELOR FUNCȚIE DE NIVELUL EDUCAȚIONAL

În grupul CVS două paciente au avut studii medii din postura de absolvente ale unor școli profesionale – o pacientă din mediul urban și o pacientă din mediul rural; în grupul Amniocenteză, din 323 de paciente, 26 de paciente (8%) au prezentat studii medii, majoritatea (17 paciente) provenind din mediul rural.

6.5 DISTRIBUȚIA PACIENTELOR PE GRUPE DE VÂRSTE

Limitele de vârstă sunt cuprinse între 25 - 42 de ani în cazul procedurii de Biopsie de Vilozități Coriale (CVS), și respectiv 25 - 41 de ani în cazul procedurii Amniocenteză. Vârsta medie a sarcinii în grupul Amniocenteză a fost de 32.7 ani (mediana de 32 ani), în timp ce în grupul

6.6 NIVELUL DE CUNOȘTIȚE PREMERGĂTOR

Nivelul de cunoștințe premergător efectuării procedurii de diagnostic prenatal, pacientele au fost chestionate cu privire la gradul de informare și sursa acestor informații. Majoritatea pacientelor (63%) au primit informații despre procedura pe care urmau să o efectueze de la medicii curanți obstetricieni și anume detalii despre tehnica de lucru, riscurile aferente, utilitatea acestei proceduri și posibilele rezultate.

Cea mai frecventă indicație pentru efectuarea Biopsiei de Viloziță Coriale a fost vârsta avansată (peste 35ani) în 44% din cazuri. Aceste paciente au optat pentru CVS în detrimentul unor teste biochimice de screening prenatal precum Testul combinat sau Triplu test.

Cea mai frecventă indicație pentru efectuarea Amniocentezei a fost testul screening biochimic pozitiv (Triplu test) în 80% din cazuri.

6.7 DISTRIBUȚIA ÎN FUNCȚIE DE STADIUL GESTAȚIEI, EXPRIMAT ÎN SĂPTĂMÂNI, LA CARE GRAVIDELE AU EFECTUAT INTERVENȚIILE DE DIAGNOSTIC PRENATAL

Majoritatea gravidelor care au efectuat Amniocenteză s-au prezentat la vârsta gestațională de 16 săptămâni (vârsta medie gestațională de 18.6 săptămâni, mediana vârstei gestaționale de 18 săptămâni) pe un interval cuprins între 14 – 27 săptămâni de sarcină, în timp ce gravidele care au efectuat Biopsia de Viloziță Coriale s-au prezentat în marea majoritate la vârsta gestațională de 13 săptămâni pe un interval cuprins între 11-13 săptămâni de sarcină (vârsta medie de gestație 12.19 săptămâni, mediana vârstei gestaționale 12 săptămâni).

6.8 TESTELE GENETICE EFECTUATE

În 75 cazuri (23%) nu au fost obținute culturi viabile pentru cariotipare din lichidul amniotic, efectuându-se FISH pentru confirmarea rezultatului QF-PCR inițial. Culturile au fost

considerate eșuate la 14 zile de la recoltare (7 zile cultura celulară inițială și 7 zile reînsămânțare pe un nou mediu de cultură) când nu a fost detectată activitate proliferativă.

În 75 cazuri (23%) nu au fost obținute culturi viabile pentru cariotipare din lichidul amniotic, efectuându-se FISH pentru confirmarea rezultatului QF-PCR inițial. Culturile au fost considerate eșuate la 14 zile de la recoltare (7 zile cultura celulară inițială și 7 zile reînsămânțare pe un nou mediu de cultură) când nu a fost detectată activitate proliferativă.

Cea mai frecventă analiză genetică efectuată în grupul Amniocenteză a fost QF-PCR realizată în total la 323 cazuri. La două paciente analiza QF-PCR a fost repetată datorită contaminării probelor de lichid amniotic cu sânge matern și a fost necesară pentru separarea profilului AND matern de cel fetal.

În grupul cu Biopsie de Vilozități Coriale au fost constatare 2 cazuri de eșec al culturilor celulare, în locul Cariotipului efectuându-se conform protocolului analiza FISH. Analiza cel mai frecvent efectuată în grupul Biopsie de Vilozități Coriale a fost tot QF-PCR pentru cromozomii 13, 18, 21, X și în 36 de cazuri. Analiza Cariotip a fost efectuată în 34 de cazuri, testul Chamberlain pentru detecția delețiilor în gena DMD a fost realizată în 2 cazuri, în timp ce testul pentru gena CFTR a fost realizat în două cazuri.

7 REZULTATELE STUDIULUI

Deși Cariotiparea clasică este considerată de mulți specialiști a fi în continuare standardul de aur al diagnosticului prenatal (Mujezinovic & Alfirevic, 2012; RCOG, 2010), atitudinea colectivului medical a fost de a analiza situația fiecărei paciente în parte, luând în calcul factori cum ar fi vârsta pacientei, vârsta de gestație, statusul psihic al pacientei și contextul social, înainte de a lua o decizie asupra tipului de investigație genetică ce urma a fi desfășurată.

Rezultatele testelor au fost împărțite în două categorii: normale și patologice.

În ceea ce privește rezultatele patologice toate buletinele de analiză citogenetică au specificat detaliat tipul de anomalie cromozomială sau genică identificată.

7.1 RELAȚIA DINTRE VÂRSTA MATERNĂ AVANSATĂ ȘI RISCUL APARIȚIEI ANOMALIILOR CROMOZOMIALE LA PRODUSUL DE CONCEPȚIE

Vârsta maternă de peste 35 de ani a reprezentat indicația principală de diagnostic prenatal datorită riscului crescut pentru aneuploidii.

Trisomia 21 este anomalia cromozomială cu cea mai mare incidență întâlnită în rândul sarcinilor cu vârsta maternă avansată, creșterea incidenței la naștere a acestei anomalii făcându-se direct proporțional cu creșterea vârstei mamei.

La vârsta de 42 ani riscul nașterii unui copil cu Sindrom Down devine de patru ori mai mare decât riscul de deces fetal prin Amniocenteză și depășește cu 68% riscul de deces fetal prin Biopsie de Vilozități Coriale (Enzensberger et al., 2012)

7.2 REZULTATELE TESTELOR CITOGENETICE DE CONFIRMARE LA PACIENTELE CU SCREENING BIOCHIMIC POZITIV

Screeningul biochimic al sarcinilor cu risc are rolul de a depista posibilele anomalii cromozomiale sau alte defecte sau boli congenitale, acesta nefiind însă suficient pentru diagnosticul, ci mai degrabă pentru suspiciunea lor, până la realizarea testelor citogenetice de confirmare ale anomaliilor cromozomiale.

Din lotul de 323 paciente care au efectuat procedura de Amniocenteză, 261 paciente au prezentat screening biochimic pozitiv prin Test Combinat, Triplu Test sau Quad Test, motiv pentru care în continuare li s-au efectuat testele citogenetice QF-PCR - Cariotipare sau QF-PCR - FISH însoțite în anumite cazuri și de analize suplimentare, pentru punerea diagnosticului de certitudine. În urma desfășurării investigațiilor, 237 dintre cele 261 cazuri au fost detectate ca fiind patologice, iar celelalte 24 au fost detectate ca fiind normale.

7.3 REZULTATELE TESTELOR CITOGENETICE DE CONFIRMARE LA PACIENTELE CU RECOMANDARE DIN PARTEA UNUI MEDIC GENETICIAN

Aceste paciente s-au adresat în urma efectuării unui consult genetic la un medic specialist genetician.

Motivele prezentării pacientelor la un astfel de consult au fost reprezentate de existența unor antecedente personale patologice sau heredo-colaterale.

În lotul de paciente care au efectuat procedura de Biopsie de Vilozități Coriale, toate 27 paciente au prezentat recomandare în urma efectuării unui Consult Genetic, motiv pentru care în continuare li s-au efectuat testele citogenetice QF-PCR - Cariotipare sau QF-PCR - FISH, pentru stabilirea diagnosticului de certitudine, cât și alte teste în funcție de contextul clinic al fiecărei paciente în parte.

În urma desfășurării investigațiilor, 12 dintre cele 27 cazuri au fost detectate ca fiind patologice – reprezentate de 1 caz Translocație Cromozomială, 1 caz Sindrom Cri du Chat, 2 cazuri Duplicație Submicroscopică Microsatelitară, 1 caz Trisomie 9, 1 caz Monosomie Parțială Cromozom 2, 1 caz Trisomie 18, 3 cazuri Trisomie 21, 2 cazuri Distrofie Musculară Duchenne, iar celelalte 15 au fost detectate ca fiind normale.

Din lotul de 323 paciente care au efectuat procedura de Amniocenteza, 25 paciente au prezentat recomandare **in urma efectuării unui consult genetic**, motiv pentru care în continuare li s-au efectuat testele citogenetice QF-PCR - Cariotipare sau QF-PCR - FISH, pentru punerea diagnosticului de certitudine, cat si alte teste in functie de contextul clinic al fiecarei paciente in parte.

În urma desfășurării investigațiilor, 5 dintre cele 25 cazuri au fost detectate ca fiind patologice – reprezentate de 1 caz Fibroză Chistică, 1 caz Inversiune Cromozomială, 1 caz Duplicație Cromozomială, 2 cazuri Trisomie 21, iar celelalte 20 au fost detectate ca fiind normale.

8 CAZURI CLINICE

Cazurile prezentate pledează pentru necesitatea și utilitatea efectuării investigațiilor genetice prenatale, atunci când este cazul. Obținerea unui diagnostic genetic prenatal corect și complet, permite acordarea unui sfat genetic avizat, care să aiba drept scop final limitarea apariției nou-născuților cu handicap genetic.

9 DISCUȚII

Prin prezentarea detaliată a rezultatelor studiului efectuat pe cele două loturi însumând 358 cazuri pentru procedura de Biopsie de Vilozități Coriale, respectiv Amniocenteza, lucrarea de față a avut ca scop evaluarea eficacității celor două proceduri implicate în diagnosticul prenatal.

În urma efectuării celor 350 de proceduri, rata de deces fetal în ambele loturi a fost nulă, 8 paciente din Lotul de Amniocenteza și 2 paciente din Lotul de Biopsie de Vilozități Coriale au resimțit o senzație de presiune la locul puncției în primele 3 ore de la efectuarea procedurii, iar 1 pacienta din Lotul de Amniocenteza a resimțit contracții în primele 3 ore de la procedură.

În ceea ce privește utilitatea Amniocentezei, aceasta este de necontestat, datorită ratei de deces fetal reduse și a acurateții procedurii în prelevarea materialului necesar detectării aneuploidiilor, a anomaliilor structurale și a modificărilor genice.

Pe baza datelor prezentate, prin comparație cu Amniocenteza, aplicabilitatea clinică a Biopsiei de Vilozități Coriale este limitată de existența unei placentе jos inserate sau inserate la nivelul peretelui posterior al uterului, ceea ce poate reprezenta un dezavantaj major al procedurii.

Ambele proceduri implicate în diagnostic prenatal – Biopsie de Vilozități Coriale și Amniocenteza – sunt proceduri sigure și eficiente de extragere a materialului biologic destinat detectării aneuploidiilor cromozomiale și a anomaliilor genice..

Este recomandat ca în primul trimestru de sarcină Consultul Genetic să fie complementar Consultului Obstetrical, și chiar să îl preceadă atunci când avem de a face cu un istoric familial de boli ereditate cum ar fi Hemofilia, Talasemia, Fibroza Chistică sau Distrofiile Musculare.

Recomandările către un Consult Genetic trebuie făcute de către Medicul de Familie sau Medicul Obstetrician care au acces la informații legate de istoricul familial, iar o problemă majoră, cum ar fi costurile analizelor moleculare de identificare a mutațiilor genice, trebuie rezolvată prin argumentarea utilității acestor analize pentru întreaga familie.

9.1 DIFICULTĂȚI DE INTERPRETARE

Deși, de cele mai multe ori, rezultatul unei investigații prenatale este clar, pot apărea situații cu dificultăți în interpretare. Probleme apar și când investigația nu este reușită sau când se obțin rezultate neașteptate.

a) Nereușita recoltării sau a cultivării:

În aproximativ 1% din procedurile de amniocenteză proba obținută nu este corespunzătoare pentru însămînțare, fiind în cantitate redusă sau de calitate scăzută (amestec de sânge sau alte tipuri de țesuturi). Grație tehnicilor de citogenetică moleculară, mai exact Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (QF-PCR), ADN-ul fetal poate fi diferențiat de ADN-ul matern și analizat atât din punct de vedere al anomaliilor cromozomiale cât și al anomaliilor genice (Medical Genetics, 2006).

În cazul biopsiei de vilozități coriale (CVS) rata de eșec cumulată a prelevărilor și însămînțărilor acceptată internațional este cuprinsă între 2.5 și 4.8% (Young, von Dadelszen, & Alfirevic, 2013) cu o medie la 3% considerată a fi standardul de aur, iar amniocenteza poate fi folosită ca alternativă cu riscuri reduse de avort spontan (RCOG, 2010).

b) Rezultatul ambiguu al analizei cromozomiale:

În aproximativ 1% din cazuri, biopsia de trofoblast (vilozități coriale) relevă un aparent mozaicism cromozomial (prezența a două sau mai multe linii celulare cu seturi cromozomiale diferite).

Pentru a stabili substratul mozaicismului obținut la biopsia de vilozități coriale, este necesară efectuarea amniocentezei după săptămâna 14-15 de sarcină. Dacă rezultatul acesteia va

fi normal, atunci rezultatul obținut anterior prin biopsie de vilozități coriale nu este un indicator fidel al cariotipului fetal(RCOG, 2010).

Sfatul genetic în cazul cuplurilor aflate în situația unui mozaicism este întotdeauna dificil. Chiar dacă mozaicismul este confirmat, nu se poate prezice fenotipul copilului, pentru că aprox 60% din mozaicurile cromozomilor sexuali prezintă fenotip în limite normale, decât prin recoltarea unei probe de sânge fetal pentru cariotipare prin cordocenteză cu riscurile aferente. Orice opțiune ar alege părinții, este important să se recolteze țesut fetal (sânge, tegument, placentă) în momentul nașterii, respectiv al întreruperii de sarcină, pentru a se clarifica rezultatele obținute inițial(Covic et al., 2011)

c) Un rezultat neașteptat al analizei cromozomiale :

Pot apărea trei feluri de rezultate cromozomiale neașteptate, fiecare dintre acestea necesitând sfat genetic:

- o altă anomalie cromozomială numerică
- un rearanjament cromozomial structural
- prezența unui marker cromozomial sau derivativdescoperit la amniocenteză sau la biopsia de trofoblast (vilozități coriale)

9.2 TRATAMENTUL BOLILOR GENETICE

Modalitățile de tratament ale bolilor genetice sunt reprezentate de:

a. Ameliorarea fenotipului - este o metoda aplicabilă tuturor tipurilor de boli genetice și constă în realizarea corecțiilor chirurgicale (proteze valvulare, valvuloplastii, grefe vasculare, reconstrucții de sept), educarea specială a copiilor cu sindrom Down, administrarea de beta-blocante pentru prevenirea coarctației de aortă în sindromul Marfan, evitarea expunerii la agenții de mediu, transplant de măduvă în siclemie etc.

b. Ameliorarea anomaliilor metabolice - ameliorarea dereglărilor metabolice determinate de funcționarea defectoasă a diferite enzime poate fi realizată prin modificarea dietei alimentare

și substituie enzimatică. Limitarea aportului anumitor substanțe poate preveni acumularea de metaboliți toxici care în mod normal r fi dezintegrați sub acțiunea enzimelor deficitare.

c. Înlocuirea unei substanțe deficitare - în această categorie pot fi incluse sindroamele gonozomale în care efectele deficitului de hormoni sexuali pot fi combătute prin terapia de substituție, sau tulburările neurologice asociate sindroamelor genetice care pot fi ameliorate sub tratament cu factori de creștere insulin-like (IGF1).

d. Modularea expresiei genice (MEG) - prin această tehnică este modificată expresia unei gene în diferite stadii în vederea ameliorării afecțiunii cauzate de funcționarea deficitară a acestei gene.

e. Terapia genică - terapia genică este o tehnică experimentală prin care genele sunt utilizate pentru prevenirea unor afecțiuni.

Prevenirea apariției unei boli genetice în populație are consecințe atât pentru cuplu, cât și pentru societate, putând modifica distribuția bolilor, îmbunătățind starea de sănătate a populației și reducând costul pentru sănătate (prevenirea nașterii unui copil cu SD este mai puțin costisitoare pentru societate decât întreținerea lui).

9.3 TRATAMENTUL PRENATAL

Până la introducerea terapiei genice atenția s-a concentrat pe diagnosticul prenatal al anomaliilor genetice, cu opțiunea întreruperii de sarcină ca tratament prenatal. Se speră ca, prin intermediul terapiei genice va fi posibil tratamentul efectiv *in utero* al tulburărilor genice.

9.4 ASPECTE ETICE ÎN DIAGNOSTICUL PRENATAL

Descoperirile în domeniul biotehnologiei reproductive au permis efectuarea a numeroase intervenții printre care și testarea embrionilor pentru detectarea defectelor genetice cauzatoare de

boli severe. În curând va fi posibilă precizarea celor mai multe dintre afecțiunile fiecărui individ, pe care acesta le poate dezvolta în timp sau pe care le poate transmite generațiilor următoare. Cu toate acestea defectele severe identificate la naștere sunt în creștere, afectând aprox. 2-3% din sarcini, în timp ce incidența deceselor prin infecție sau prematuritate este în scădere.

Sfatul genetic are ca scop informarea cuplului asupra consecințelor afecțiunii, asupra modalităților de tratament și asigurarea suportului moral, lăsând cuplul să ia o decizie în funcție de propriile valori. Cuplurile pot alege liber dacă doresc să beneficieze de sfat genetic și unde să meargă pentru a îl primi asigurându-se astfel caracterul non-direcțional al sfatului genetic.

Întreruperea sarcinii este permisă până la 16 săptămâni de gestație, dacă există riscul ca fătul să aibă o anomalie gravă și este permisă în orice moment pe durata sarcinii, dacă viața mamei este în pericol sau pentru a se preveni o afectare permanentă a stării fizice sau mentale a mamei. Diagnosticarea unei sarcini anormale în trimestrul al doilea permite întreruperea sarcinii până la 24 săptămâni de gestație, vârsta la care se dezvoltă structura și funcțiile creierului necesare generării și susținerii conștiinței și vieții mentale a individului.

10 CONCLUZII

1. Screeningul genetic este necesar în cazul tuturor sarcinilor indiferent de vârstă, paritate sau patologie datorită riscului de apariție a anomaliilor genetice în rândul gravidelor de vârstă tânără (<29 ani).
2. Necesitatea consultanței genetice pre-concepție pentru a investiga istoricul personal și heredo-colateral de anomalie structurală sau cromozomială al cuplului cu scopul de a determina riscul apariției unui produs de concepție malformat și de a stabili etapele diagnosticului genetic prenatal.
3. Cea mai frecventă indicație de diagnostic prenatal este riscul crescut stabilit printr-o metodă de screening pentru pacientele care efectuează Amniocenteza, respectiv

istoricul personal și heredo-colateral de anomalie structurală sau cromozomială pentru pacientele care efectuează Biopsia de Vilozități Coriale.

4. Procedurile invazive de diagnostic prenatal prezintă riscuri mici de avort spontan – Biopsia de Vilozități Coriale 1%, Amniocenteza 0.06% conform datelor disponibile în literatură de specialitate. Pe loturile studiate nu s-au consemnat pierderi de sarcină în primele 72 ore de la procedură.
5. Biopsia de Vilozități Coriale este o alternativă viabilă la procedurile clasice – Amniocenteza și Cordocenteza – de diagnostic prenatal și prezintă avantajul unui diagnostic stabilit încă din luna a 3-a de sarcină în condiții de siguranță și confort maxim pentru pacientă.
6. Diagnosticarea unei anomalii cromozomiale aduce în discuție de cele mai multe ori întreruperea sarcinii, dar această decizie aparține cuplului după consilierea (sfatul genetic) acordată de medicul curant genetician.
7. Necesitatea consultanței genetice post-intervenție, deoarece pot apărea situații în care implicațiile pentru făt sunt greu de prezis, chiar dacă semnificația celor mai multe metode de diagnostic prenatal este clară.
8. Necesitatea informării medicilor curanți obstetricieni și a medicilor de familie cu privire la importanța consultului genetic și la utilitatea procedurilor invazive de diagnostic prenatal.

ELEMENTE DE NOUȚATE ALE STUDIULUI

Este primul studiu din România care investighează gravide cu vârste cuprinse între 13 și 28 săptămâni de sarcină folosind concomitent diagnosticul echografic, tehnici de citodiagnostic (cariotip, FISH) și diagnostic genetic molecular (QF-PCR).

Este primul studiu din România care compară rezultatele a două tehnici invazive de diagnostic genetic prenatal efectuate în cadrul unui centru românesc de diagnostic și tratament prenatal – Spitalul Clinic de Obstetrică și Ginecologie.

Este primul studiu din România care arată utilitatea biopsiei de trofoblast în stabilirea diagnosticului genetic prenatal prin descrierea complicațiilor și demonstrarea riscului scăzut de avort postprocedural.

Este primul studiu din România în care cuplurile au beneficiat de sfat genetic după identificarea unor anomalii genetice sau malformații congenitale depistate prin examen echografic și teste genetice.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Aaron, N., & Zehner, O. (2008). Which half is mommy? tetragametic chimerism and trans-subjectivity. *Womens Studies Quarterly, Fall/Winte*, 106–127.
- Covic, M., Stefanescu, D., & Sandovici, I. (2011). *Genetica Medicala (II)*. Bucuresti: Polirom BIOS.
- Enzensberger, C., Pulvermacher, C., Degenhardt, J., Kawacki, A., Germer, U., Gembruch, U., ... Axt-Fliedner, R. (2012). Fetal loss rate and associated risk factors after amniocentesis, chorionic villus sampling and fetal blood sampling. *Ultraschall in Der Medizin (Stuttgart, Germany : 1980)*, 33(7), E75-9. <http://doi.org/10.1055/s-0031-1299388>
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J., Waldman, F., & Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors, 258, 818–821.
- Kotzot, D. (1999). Abnormal phenotypes in uniparental disomy (UPD): fundamental aspects and a critical review with bibliography of UPD other than 15. *Am J Med Genet*, 82, 265–274.
- Langlois, S., & Duncan, A. (2011). Use of a DNA method, QF-PCR, in the prenatal diagnosis of fetal aneuploidies. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada : JOGC = Journal D'obstétrique et Gynécologie Du Canada : JOGC*, 33(September), 955–60.
- Medical Genetics, A. C. (2006). *Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories*. American College of Medical Genetics.
- Mujezinovic, F., & Alfirevic, Z. (2012). Technique modifications for reducing the risks from amniocentesis or chorionic villus sampling. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 8, CD008678. <http://doi.org/10.1002/14651858.CD008678.pub2>
- RCOG. (2010). Amniocentesis and Chorionic Villus Sampling 2010. *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, RCOG Green(8)*, 1–13. Retrieved from <https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/gt8amniocentesis0111.pdf>

- Saadi, A. V., Kushtagi, P., Gopinath, P., & Satyamoorthy, K. (2010). Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction (QF-PCR) for Prenatal Diagnosis of Chromosomal Aneuploidies. *Int J Hum Genet*, *10*(3), 121–129.
- Stan, A. (2013). *CERCETĂRI PRIVIND POSIBILITATEA INTRODUCERII UNOR TEHNICI DE BIOLOGIE MOLECULARĂ ÎN DIAGNOSTICUL PRENATAL NEINVAZIV ȘI INVAZIV*. UMF "Carol Davila".
- Steer, C., Campbell, S., Davies, M., Mason, B., & Collins, W. (1989). Spontaneous abortion rates after natural and assisted conception. *British Medical Journal*, *299*, 1317–1318.
- Young, C., von Dadelszen, P., & Alfirevic, Z. (2013). Instruments for chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Systemic Review*.
<http://doi.org/10.1002/14651858>