

Original Article/Artigo Original

Chorionic Villus Sampling in Hospital S. Teotónio Fetal Medicine Unit

Biópsia de Vilosidades Coriônicas: Experiência da Unidade de Medicina Fetal do Hospital S. Teotónio

Ana Sousa*, James Anderson**, Isabel Cerveira**, Sérgio Castedo***, Susana Pereira**

Hospital S. Teotónio, Centro Hospitalar Tondela-Viseu

Abstract

Overview and Aims: Chorionic villus sampling (CVS) is a prenatal test performed from the 11th week of gestation. Risks related to this technique, when performed by experienced operators, are similar to those of amniocentesis. The authors present their experience on CVS following the routine first trimester aneuploidy screening among a non-selected low risk population.

Study design: Retrospective study

Population: All patients who underwent CVS procedure at our unit, between October 2008 and March 2011.

Methods: 4.304 screening tests were performed (by certified operators, using the Fetal Medicine Foundation algorithm) out of which 240 patients opted for CVS after an individualized counseling on the risk of aneuploidy and the risks/benefits of the technique. The CVS were performed transabdominally by 4 operators with local anesthesia and aspiration through a 17G needle. Follow up consisted on the knowledge of the pregnancy's outcome or, at least, anomaly scan results.

Results: A total of 240 CVS were performed, from 11 to 14 weeks of gestation. One case was excluded due to lack of follow up. 205 (85,8%) normal karyotypes and 29 (12,1%) abnormal results: trisomy 21 (10), triploidy (5), trisomy 18 (3), 45,X (2), trisomy 13 (1), trisomy 4 (1), trisomy X (1), trisomy 14 mosaicism (1), trisomy 2 mosaicism (1), mosaicism 45,X/46,XY (1), mosaicism 92,XXYY/46,XY (1), chromosomes 5 and 12 translocation (1), chromosome 15 deletion (1). We failed to obtain results for 5 patients (2,1%): maternal contamination (3); cell culture failure (2). Eight cases (3,3%) required amniocentesis: mosaicism (4); maternal contamination (3); cell culture failure (1). There were 4 fetal losses, all regarding malformed fetuses, only 1 within 14 days of the procedure.

Conclusions: CVS was successfully implemented at our unit, as a first trimester invasive technique for fetal karyotyping, following aneuploidy screening.

Keywords: Chorionic villus sampling, aneuploidy, first trimester screening, pregnancy

* Interna Complementar de Ginecologia/Obstetrícia

** Assistente de Ginecologia/Obstetrícia

*** Professor Associado de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

INTRODUÇÃO E OBJECTIVO

A Biópsia das Vilosidades Coriônicas (BVC) é uma técnica invasiva de diagnóstico pré-natal que pode ser realizada a partir das 11 semanas. Consiste na obtenção ecoguiada de fragmentos de placenta por aspiração através de uma agulha. Os riscos associados à técnica, quando executada por operadores treinados, são semelhantes aos da amniocentese.^{1,2}

Os autores apresentam a sua experiência na realização das primeiras 240 BVC numa unidade de diagnóstico pré natal e medicina fetal, no contexto do rastreio populacional de cromossomopatias e malformações major no primeiro trimestre.

POPULAÇÃO E MÉTODOS

Estudo retrospectivo do período de 1 Outubro de 2008 a 31 de Março de 2011. Neste período foram referenciadas ao hospital 4304 grávidas que realizaram colheita de sangue para os marcadores bioquímicos PAPP-A e β -HCG livre entre as 9 e as 13 semanas e 6 dias e ecografia detalhada entre as 11 e as 13 semanas e 6 dias. Os resultados bioquímicos e ecográficos foram integrados com a idade materna para cálculo do risco de aneuploidias pelo algoritmo da Fetal Medicine Foundation (FMF) por médicos acreditados por esta instituição. O rastreio foi considerado positivo quando o risco foi superior a 1:250 à data da ecografia. Independentemente do risco obtido, o resultado do rastreio foi discutido individualmente com cada casal, que decidiu pela realização ou não de técnicas invasivas de diagnóstico, após explicação dos riscos e benefícios dos procedimentos.

Também foram aceites para realização de BVC na unidade, utentes referenciadas por rastreio positivo realizado em outras instituições.

Foram incluídas neste trabalho todas as BVC realizadas entre as 11 e as 14 semanas, no período em estudo. Todos os procedimentos foram realizados por via abdominal, com assepsia local e anestesia da pele e do tecido celular subcutâneo com cloridrato de lidocaína a 1%. Foi utilizada agulha descartável de 17 Gauge e efectuada aspiração das vilosidades com o auxílio de um extensor e uma seringa de 20 ml, heparinizados. As BVC foram executadas por 4 operadores, um acreditado pela FMF e 3 em curva de aprendizagem, tutorados pelo primeiro, sendo que 87% dos procedimentos foram realizados pelos mesmos 2 operadores.

O material colhido foi colocado no meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Invitrogen) e enviado ao laboratório de Genética Médica, juntamente com uma amostra de sangue da grávida (em tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA) para exclusão de

contaminação com células maternas.

Foi efectuada a profilaxia da isoimunização Rh às grávidas Rh negativo, com 300 μ g de imunoglobulina anti D. A frequência cardíaca fetal foi confirmada imediatamente após cada procedimento. Foi reforçada a necessidade de contactar a Unidade ou o Serviço de Urgência de Obstetria em caso de hemorragia vaginal e/ou febre. Foram consideradas complicações major aquelas que resultassem em risco de vida materno ou perda fetal até duas semanas após o procedimento. O *follow up* foi considerado conhecido sempre que se teve acesso ao desfecho da gravidez ou, pelo menos, ao resultado da ecografia morfológica realizada após as 20 semanas.

Para o estudo citogenético, o material colhido foi analisado sob lupa, tendo sido rejeitado o tecido decidual e/ou coágulos de sangue eventualmente presentes. Após digestão enzimática com colagenase, o material seleccionado foi dividido em duas partes: uma destinada a cultura *in vitro* a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ e a outra destinada a extracção de ADN para pesquisa rápida de aneuploidias e detecção de eventual contaminação materna. O estudo cromossómico foi realizado pelo método *in situ*, tendo os cromossomas sido corados pela técnica de bandas GTL, de acordo com protocolos convencionais. O despiste de contaminação materna foi realizado através da comparação do perfil de marcadores polimórficos amplificados por PCR obtidos a partir do ADN extraído das vilosidades com o perfil obtido a partir do sangue da grávida. A pesquisa rápida de aneuploidias dos cromossomas 13, 18, 21, X e Y foi realizada pela técnica *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) (MRC-Holland) com o kit P095 ou por PCR multiplex quantitativo com marcadores polimórficos para os referidos cromossomas.

RESULTADOS

Das 240 BVC efectuadas no período em estudo, foi excluído 1 caso, perdido para *follow up*. Nos 239 casos em análise, as indicações para o procedimento dividiram-se em rastreio do primeiro trimestre positivo (n=136; 56,9%), pesquisa de síndrome genético familiar (n=7; 2,9%), anomalia estrutural (n=4; 1,7%) – megabexiga: 1; gastrosquise: 1; regressão caudal: 1; onfalocelo: 1 –, suspeita ecográfica de triploidia (n=3; 1,3%), e ansiedade materna (n=89, 37,2%). Este último grupo é constituído por grávidas que, apesar do rastreio negativo, optaram pela realização da técnica, sendo que 42% tinham trânsito de nuca acima do percentil 95 e 38,6% tinham idade igual ou superior a 35 anos (com risco final baixo).

Resultados Citogenéticos:

Os resultados da pesquisa rápida de aneuploidias (cromossomas 13, 18, 21, X e Y) e o cariótipo completo ficaram disponíveis em média 4 e 7 dias úteis após a BVC, respectivamente. Registaram-se 205 (85,8%) resultados normais e 29 (12,1%) resultados anómalos: trissomia 21 (10), triploidia (5), trissomia 18 (3), monossomia do X (2), trissomia 13 (1), trissomia 4 (1), trissomia X (1), trissomia 14 em mosaico (1), trissomia 2 em mosaico (1), mosaïcismo 45,X/46,XY (1), mosaïcismo 92,XXYY/46,XY (1), translocação entre os cromossomas 5 e 12 (1) e deleção do braço longo do cromossoma 15 (1).

Em 5 casos (2,1%) não foi possível a obtenção do resultado: em 3 casos (1,3%) devido à contaminação por células maternas e em 2 casos (0,8%) por falha de crescimento de células fetais em cultura. Em 8 casos (3,3%) foi necessária a realização de amniocentese: os 4 casos de mosaïcismo (1,7%), os 3 casos de contaminação materna e 1 dos casos de falha de crescimento de células em cultura (sendo que no outro, ocorreu morte fetal *in utero* às 16 semanas).

Todos os casos de trissomia 21, 13, 18, triploidia e monossomia X foram diagnosticados por PCR (pesquisa rápida) e confirmados após cultura. No caso de trissomia X e de mosaico 92,XXYY/46,XY a PCR foi inconclusiva e no caso de mosaico 45,X/46,XY foi normal, pelo que estes diagnósticos só foram estabelecidos após cultura.

Complicações e seguimento

Registaram-se 3 complicações clínicas minor, sem necessidade de terapêutica específica: um hematoma da parede abdominal (0,4%), um caso de hemorragia vaginal sem abortamento (0,4%) e uma reacção vagal (0,4%). Em nenhum caso foi necessário efectuar mais que uma inserção da agulha.

Há a referir 4 casos de morte fetal: um no primeiro trimestre, em que se constatou foco negativo 3 dias após o procedimento, sem registo de hemorragia vaginal até ao diagnóstico. Neste caso a BVC foi efectuada por rastreio positivo para trissomia 13/18, associada a suspeita de malformação cardíaca. O cariótipo foi normal e o estudo fetopatológico confirmou a presença de malformação cardíaca (dilatação ventricular direita e comunicação interventricular mesoseptal).

No segundo caso, a morte fetal registou-se às 17 semanas; a BVC foi efectuada por rastreio positivo para trissomia 21 e 13/18, sendo o cariótipo normal; apresentava megabexiga (<15mm) no primeiro trimestre e malformação urológica e restrição de crescimento no segundo trimestre. O exame fetopatológico revelou RCIU e síndrome

polimalformativo major (malformação renal quística compatível com síndrome de válvula uretral posterior (microquistos tubulares renais e dilatação piélica); rins fundidos na linha média.

No terceiro caso, ocorreu morte fetal às 26 semanas. A BVC foi efectuada por rastreio positivo para trissomia 13/18 e megabexiga (<15mm). O cariótipo foi normal e na ecografia morfológica foi detectado rim único em posição pélvica. O exame fetopatológico confirmou a existência de rim pélvico em ferradura e relatou ainda imperfuração anal e micropénis, além de outras malformações minor.

No último caso, a BVC foi efectuada por suspeita de triploidia. O cariótipo não foi determinado por falha de crescimento de células fetais em cultura (sendo o PCR normal) e a morte fetal ocorreu às 16 semanas de gestação, antes da realização de amniocentese. O exame fetopatológico revelou RCIU, artéria umbilical única, alterações minor do habito externo (micrognatia, filtrum alto, fenda palpebrais oblíquas, pavilhões auriculares de implantação baixa) e microquistos tubulares renais.

Trinta das grávidas submetidas a BVC optaram pela interrupção médica da gravidez: 23 por cromossomopatia, 4 por malformação fetal major com cariótipo normal, 2 por atrofia muscular espinhal e 1 por deleção responsável pelo síndrome de Angelman/Prader-Willi. Estas interrupções decorrentes da avaliação do primeiro trimestre ocorreram entre as 11 e as 18 semanas (moda e mediana = 14 semanas).

Excluindo os 3 casos de morte fetal até às 17 semanas, as demais 206 grávidas realizaram ecografia morfológica entre as 18 e 20 semanas de gestação e foram diagnosticadas 6 malformações major: 2 casos de malformação cardíaca grave, 2 casos de malformação renal multiquística, 1 caso de displasia tanatofórica tipo I e 1 caso de malformação adenomatosa quística (MAQ). Nos primeiros cinco casos, as grávidas optaram pela interrupção da gravidez. No caso de MAQ o diagnóstico foi confirmado no período pós-natal por ressonância magnética. O diagnóstico da displasia esquelética foi efectuado na ecografia morfológica às 20 semanas e foi confirmada displasia tanatofórica tipo I por método de microarray (mutação c.742C>T em heterozigotia no gene FGFR3) em DNA extraído do material da BVC.

Das 200 gestações que evoluíram, 196 nasceram sem malformações major não identificadas no período pré-natal. Em 4 casos, não foi possível confirmar o desfecho final da gravidez (sendo que se confirmou uma evolução normal da gravidez até às 20-24 semanas, na ecografia morfológica).

DISCUSSÃO

No panorama actual de diagnóstico pré-natal e com a antecipação do rastreio de cromossomopatias para o primeiro trimestre, sublinha-se a importância de uma alternativa precoce e segura à amniocentese, para o diagnóstico invasivo, minimizando os riscos médicos e o impacto psicológico de eventuais intervenções.

A taxa de biópsias realizadas foi de 5,7% do total de rastreios, sendo que as biópsias efectuadas por rastreio positivo corresponderam a 3,2% dos rastreios. Dos casos em que a BVC foi efectuada por ansiedade materna, 38,6% apresentaram idade materna superior a 35 anos (traduzindo o estigma que este factor ainda tem na nossa população) e em 42% a translucência da nuca estava acima do P₉₅ (revelando o peso atribuído isoladamente a este parâmetro do rastreio pela população médica e de grávidas).

Existe um único estudo randomizado que compara a realização de amniocentese com atitude expectante, chegando a um risco relacionado com a técnica de 1%.³ Não existe nenhum trabalho semelhante para as BVC. Existem no entanto alguns estudos comparativos entre as BVC e a amniocentese. Smidt-Jensen compara a BVC por via abdominal com a amniocentese no segundo trimestre, descrevendo uma percentagem equivalente de perdas fetais.⁴ Vários estudos compararam a biópsia das vilosidades (por via abdominal e/ou transcervical)^{5,6} com a amniocentese precoce (realizada antes das 16 semanas)^{7,8}, mostrando que as taxas de abortamento após a BVC são menores que nas amniocenteses precoces^{1,2}.

É preciso não esquecer que a taxa de perda fetal espontânea é maior às 12 semanas que às 16 e espera-se maior na população com indicação para BVC. Akolekar et al desenvolveram um algoritmo para estimar o risco de perda fetal espontânea, tendo em conta as características maternas e os resultados do rastreio do primeiro trimestre. Nesse mesmo trabalho que incluiu 33856 rastreios do 1º trimestre e 2396 BVC realizadas, os autores concluem não haver aumento significativo do risco de perda fetal relacionada com a técnica de BVC (acima do risco basal calculado para aquela população), quer fosse executada por operadores experientes ou em processo de treino supervisionado.⁹

Na nossa amostra, a taxa de perda fetal total foi de 1,7%. Se consideradas apenas as perdas fetais nos 14 dias após o procedimento a taxa é de 0,4%. No único caso que cumpre este critério, o estudo feto-patológico revelou uma malformação cardíaca tornando difícil a distinção entre o risco basal e o risco atribuível a técnica.

A associação entre BVC e defeitos de redução dos membros foi descrita em 1991 quando, numa série de 289

biópsias realizadas entre as 8 e as 9 semanas, foram descritos 5 casos.¹⁰ Esta associação não foi confirmada em estudos posteriores com procedimentos efectuados após as 10 semanas.^{11,12} Na nossa amostra, em que todos os procedimentos foram efectuados após as 11 semanas, não se verificou nenhum caso de defeitos de redução dos membros.

É importante salientar que a experiência do operador em procedimentos invasivos ecoguiados é essencial para a equivalência dos riscos mencionados.^{1,2} Na UMF todos os procedimentos foram realizados ou supervisionados por operadores certificados pela FMF, com experiência em técnicas invasivas fetais ecoguiadas.

Num estudo retrospectivo de 20 anos que analisa, em intervalos de 5 anos, a taxa de abortamento após procedimentos invasivos (amniocentese *versus* BVC) foi mostrado que a taxa de abortamento pós-amniocentese era inicialmente menor do que a das biópsias, mas, à medida que a equipa se tornou mais experiente nas BVC, a taxa de abortamento igualou-se.²

Como qualquer teste, a BVC tem também limitações. Quando é diagnosticado um mosaicismo, o que acontece em 1% dos casos (*versus* 0,1% das amniocenteses), está indicada a confirmação no líquido amniótico para excluir uma alteração confinada à placenta (80-90% dos casos).¹³ Dos quatro mosaicismos encontrados (1,7%), a amniocentese confirmou a alteração nos casos de síndrome de Turner e trissomia 14 (em mosaico), sendo normal nos restantes 2 casos.

Outras limitações verificadas, que levaram também à realização de amniocentese, foram a contaminação materna da amostra de vilosidades (1,3%) e a ausência de resultado de PCR e de crescimento celular em cultura (0,8%). Esta última situação foi atribuída a insuficiência da amostra colhida.

Está descrito que 1,1% dos casos de BVC requerem um teste de diagnóstico adicional para esclarecer o resultado citogenético.¹⁴ Na nossa amostra este valor foi de 3,3%, sendo que a taxa de mosaicismos encontrada foi também superior à descrita na literatura.

Com o declínio no número de procedimentos invasivos resultante de métodos de rastreio mais efectivos, tem aumentado o debate sobre o tema da qualidade e treino de competências. A literatura tende para o consenso de que o foco deve incidir sobre o desempenho do operador e não da unidade/centro de cuidados.^{12,15,16} Apesar de não ser possível actualmente estabelecer recomendações baseadas na evidência, para o número de procedimentos anuais necessário para a manutenção de competências, o RCOG sugere um volume mínimo de 30 procedimentos/ano por operador¹², enquanto um relatório de uma Comissão de Trabalho Dinamarquesa sugere o número 100¹⁶. Operado-

res muito experientes (>100 procedimentos/ano) poderão ter maior taxa de sucesso e menor taxa de complicações.¹² No nosso centro, o treino dos três operadores ocorreu de forma sequencial e incluiu elementos internos e externos ao serviço. Este treino foi organizado de forma a que cada operador certificado do serviço efectue pelo menos 30 procedimentos por ano.

As recomendações do RCOG sublinham a importância da auditoria anual na manutenção de uma boa prática em testes invasivos, definindo como parâmetros auditáveis os seguintes: taxa de perda fetal (divididas em 3 grupos: até 14 dias após o procedimento, até às 24 semanas de gestação e até ao término da gestação); taxa de procedimentos requerendo mais que uma inserção da agulha; taxa de falha de obtenção de amostra adequada; taxa de falha de cultura laboratorial; taxa de complicações; proporção de grávidas Rh negativo em que foi feita a profilaxia da isoimunização Rh.¹²

CONCLUSÕES

A biópsia das vilosidades coriônicas, como técnica de eleição para o estudo do cariótipo fetal, no seguimento do rastreio combinado do primeiro trimestre foi introduzida na Unidade de Medicina Fetal do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do nosso hospital, com taxas de sucesso e complicações semelhantes às descritas na literatura.

BIBLIOGRAFIA

- Alfirevic Z, Sundberg K, Brigham S. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;CD003252
- Caughey AB, Hopkins LM, Norton ME. Chorionic villus sampling compared with amniocentesis and the difference in the rate of pregnancy loss. *Obstet Gynecol.* 2007 Jan;109(1):204-5
- Tabor A, Philip J, Madsen M, Bang J, Obel EB, Norgaard-Pedersen B. Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet.* 1986;1:1287-93
- Smidt-Jensen S, Permin M, Philip J, Lundsteen C, Zachary J, Fowler S, et al. Randomized comparison of amniocentesis and transabdominal and transcervical chorionic villus sampling. *Lancet.* 1992;340:1237-44
- Jackson L, Zachary J, Fowler S, Desnick R, Golbus M, Ledbetter D, et al. A randomised comparison of transcervical and transabdominal chorionic villus sampling. *New Engl J Med.* 1992;327:594-8
- Brambati B, Terzian E, Tognoni G. Randomized clinical trial of transabdominal vs transcervical chorionic villus sampling methods. *Prenat Diagn.* 1991;11:285-93
- Scott F, Peters H, Boogert T, Robertson R, Anderson J, McLennan A, et al. The loss rates for invasive prenatal testing in specialised obstetric ultrasound practice. *Aust NZ J Obstet Gynaecol.* 2002;42:55-8
- Nicolaides KH, Brizot ML, Patel F, Snijders R. Comparison of chorion villus sampling and early amniocentesis for karyotyping in 1492 singleton pregnancies. *Fetal Diagn Ther.* 1996 Jan-Feb;11(1):9-15
- Akolekar R, Bower S, Flack N, Bilardo C, Nicolaides KH. Prediction of miscarriage and stillbirth at 11-13 weeks and the contribution of chorionic villus sampling. *Prenat Diagn.* 2011; 31:38-45
- Firth HV, Boyd PA, Chamberlein P, Mac Kenzie IZ, Lindenbaum RH, Huson SM. Severe limb abnormalities after chorionic villus sampling at 56-66 days' gestation. *Lancet.* 1991; 337:762-3
- National Institute of Child Health and Human Development. Report of the NICHD workshop on chorionic villus sampling and limb and other defects. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;169:1-6
- RCOG Green-top Guideline N°8, Amniocentesis and chorionic villus sampling, 2010
- Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnostic techniques. *Fetal Diagn Ther* 2010;27:1-7
- Ledbetter DH et al. Cytogenetic results of chorionic villus sampling: high success rate and diagnostic accuracy in the United States Collaborative Study. *Am J Obstet Gynecol.* 1990; 162:495-501
- Alfirevic Z. Who should be allowed to perform amniocentesis and chorionic villus sampling? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009; 34:12-13
- The Danish National Board of Health: Report from a Working Commission "Prenatal Diagnosis and Risk Assessment" http://www.sst.dk/upload/fosterdiagnostik1_001.pdf. Copenhagen, 2003