

Hitro prenatalno določanje številčnosti spolnih kromosomov: predstavitev metodologije z verifikacijo postopka

Rapid prenatal detection of sex chromosome aneuploidies: the methodology and the verification

Alenka Erjavec-Škerget^{1*}, Špela Stangler-Herodež^{1,2}, Boris Zagradišnik¹, Nadja Kokalj-Vokač^{1,2}

¹ Laboratorij za medicinsko genetiko, Klinika za ginekologijo in perinatologijo, UKC Maribor; Ljubljanska 5, 2000 Maribor

² Medicinska fakulteta Maribor, Slomškov trg 12, 2000 Maribor

E-naslovi: alenka.erjavec@ukc-mb.si; spela.sh@ukc-mb.si; boris.zagradisnik@ukc-mb.si; nadja.kokalj-vokac@ukc-mb.si

*Avtor za korespondenco.

Povzetek: Kvantitativna fluorescentna verižna reakcija s polimerazo (QF-PCR) je uveljavljena metoda za usmerjeno, hitro, zanesljivo in poceni določanje najpomembnejših kromosomskih anomalij v prenatalni diagnostiki. To so trisomije kromosomov 13, 18 in 21, ki jih v Laboratoriju za medicinsko genetiko UKC Maribor rutinsko določamo od leta 2008 z lastno razvitim testom. Določanje številčnih sprememb kromosomov X in Y je del QF-PCR testa, ko se ta izvaja kot samostojni test. Trenutno veljavne smernice britanskega združenja za klinično citogenetiko priporočajo usmerjeno diagnostiko oz. preiskovanje prenatalnih vzorcev z metodo QF-PCR ob utemeljenem sumu na številčne anomalije spolnih kromosomov. V prispevku predstavljamo metodologijo in verifikacijo določanja številčnih anomalij kromosomov X in Y z uporabo mikrosatelitnih genetskih označevalcev z metodo QF-PCR. Gre za razširitev zmožnosti QF-PCR analize lastnega razvoja, ki vključuje pripravo optimiziranih kombinacij dodatnih devet začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kromosoma X in/ali Y za izvajanje hkratne verižne reakcije s polimerazo. Za verifikacijo smo uporabili 23 predhodno citogenetsko opredeljenih vzorcev s prisotnimi različnimi oblikami odstopanj v številu kromosomov X in Y. Predstavljeni so tudi rezultati verifikacije metode, ki je pokazala 100% ujemanje rezultatov.

Ključne besede: prenatalna diagnostika, humana genetika, številčne kromosomske spremembe, spolni kromosomi, kvantitativna fluorescentna verižna reakcija s polimerazo, QF-PCR.

Abstract: Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) is an established method for targeted, fast, reliable, and economically beneficial determination of common chromosomal abnormalities in prenatal diagnosis. The most common chromosomal abnormalities in prenatal genetics are trisomies of chromosomes 13, 18 and 21. In Laboratory of Medical Genetics, University Medical Centre Maribor, we use in-house developed QF-PCR testing for detecting them since 2008. Determination of the numerical changes in sex chromosomes X and Y is part of QF-PCR testing, when it is implemented as a separate test. The current guidelines of the British Association for Clinical Cytogenetics are recommending the use of QF-PCR testing for sex chromosomes only as targeted diagnostics at cases with reasonable suspicion of numerical abnormalities on sex chromosomes. In this paper we present QF-PCR methodology by using 9 additional sex chromosomes microsatellite genetic markers. It is based on the extension of in-house

developed QF-PCR analysis, which involves the preparation of optimized combinations of primers, specific for the chromosome X and/or Y in order to carry out the optimal system for simultaneous polymerase chain reaction. For the validation analysis we used 23 cytogenetic well-defined patterns with the presence of different types of numerical variations of chromosomes X and Y. The results of the validation analysis are presented, the 100% matching was achieved.

Key words: medical genetics, prenatal diagnostic, numerical chromosomal abnormalities, sex chromosomes, quantitative fluorescent polymerase chain reaction, QF-PCR.

1. Uvod

Kvantitativna fluorescentna verižna reakcija s polimerazo (QF-PCR) omogoča poceni in hitro dokazovanje kromosomskih številčnih sprememb. Z izborom začetnih oligonukleotidov za označevalce po posameznih kromosomih lahko vplivamo na to kaj, kje, kako ter s kakšnim namenom bomo uporabili zasnovano metodologijo za interpretacijo pridobljenih rezultatov (1). Metoda QF-PCR se dandanes uporablja v diagnostične namene za predrojstveno (pre-natalno) kot tudi za porojstveno (post-natalno) genetsko testiranje še posebej v primerih, ko je potreben hiter rezultat, ker obstaja povečano tveganje za prisotnost kromosomske aneuploidije (2). V nekaterih evropskih državah (Anglija, Španija) se zaradi dokazane uspešnosti uporabe metode QF-PCR že uporablja kot samostojna presejalna diagnostična metoda za preiskovanje najpogostejših kromosomskih anomalij v skupini nosečnic, kjer sicer obstaja povečana verjetnost njihovega pojava (3, 4).

Hitri test z metodo QF-PCR za določanje številčnih sprememb kromosomov 13, 18 in 21

Trisomija kromosoma 21 (Downov sindrom), trisomija kromosoma 18 (Edwardov sindrom) in trisomija kromosoma 13 (Patau sindrom) so najpogostejše klinično značilne številčne autosomalne kromosomske spremembe, katerih incidenca je trenutno 1 na 160 živorojenih otrok (5). Od leta 2008 v Laboratoriju za medicinsko genetiko, UKC Maribor izvajamo QF-PCR testiranje pri nosečnicah, kjer je na podlagi drugih, fenotipskih ter biokemijskih znakov v nosečnosti izračunano povišano tveganje za rojstvo otroka z aneuploidijo kromosomov 13, 18 in 21 (6). Hitri test z QF-PCR tehniko za ugotavljanje številčnih anomalij kromosomov 13, 18 in 21 opravljamo kot podporno tehniko, katere preliminarni rezultati dopolnjujejo dlje časa trajajočo citogenetsko analizo. Osnovni koncept temelji na preiskovanju 20 genetskih STR-označevalcev s kromosomov 21, 18, 13 (7). Obenem določamo še genetske označevalce s kromosomov X in Y, ki služijo za določitev spola, vendar ne omogočajo analize števila

spolnih kromosomov. Predstavljajo dodatno informacijo, ki služi za notranjo kontrolo dela pri primerjavi s citogenetskim izidom.

Hitri test z metodo QF-PCR za določanje številčnih sprememb kromosomov X in Y

Poleg izvedbe osnovne hitre prenatalne diagnostike za ugotavljanje anomalij kromosomov 13, 18 in 21, ki temelji na invazivnih izhodiščnih postopkih (amniocenteza, biopsija horionskih resic), v prispevku sedaj predstavljamo razširjeno metodo QF-PCR, ki omogoča tudi preverjanje številčnosti spolnih kromosomov. Osnovnemu hitremu testu z metodo QF-PCR smo dodali še mikrosatelitne genetske označevalce, specifične za spolna kromosoma X in Y. Skupaj metoda omogoča analizo petih kromosomov (13, 18, 21, X in Y), katerih številčne nepravilnosti predstavljajo večino (89%) kromosomskih anomalij v prenatalnem obdobju (8).

Turnerjev sindrom (45, X), Klinefelterjev sindrom (47, XXY) ter XYY sindrom so najpogostejše aneuploidije spolnih kromosomov, ki so tesno povezane z izgubo reproduktivne sposobnosti, sterilnostjo ter zaostankom razvoja govora (9). Povezujejo jih tudi z drugimi razvojnimi, telesnimi, kognitivnimi, socialnimi ter verbalnimi odmiki (10, 11). Anomalije v številu spolnih kromosomov se pojavljajo pri 1 od 500 otrok moškega ter pri 1 od 850 otrok ženskega spola (12). V novejših presejalnih študijah navajajo, da je tekom življenja pravilno diagnosticiranih samo 25% preiskovancev s Klinefelterjevimi ter 10% preiskovancev z 47,XYY sindromom (13, 14). Ostale, bolj kompleksne aneuploidije spolnih kromosomov pri moških preiskovancih (npr. 48,XXYY ali 48, XXXY) so manj pogoste: njihova prevalenca je od 1 / 18 000 do 1/20 000 živorojenih otrok (15).

Aneuploidije spolnih kromosomov tako predstavljajo pomemben faktor za preverjanje fetalnega genoma, zato naj bi bilo njihovo testiranje po britanskih priporočilih (16) vključeno v hitro prenatalno diagnostiko. Še posebej to velja v primerih, kjer zaključni izvid sloni izključno na rezultatih hitrega testa brez dodatne citogenetske analize.

Glede na analizo lastnih petletnih izkušenj (6) ter v skladu z britanskimi smernicami (16) smo se v Laboratoriju za medicinsko genetiko, UKC Maribor uvedli dodatno ciljano določanje anomalij spolnih kromosomov predvsem v primerih z določenim drugim specifičnim pokazateljem; npr. v primeru prisotnih odstopanj pri ultrazvočnem pregledu ploda. Primer specifičnega ultrazvočnega kazalnika je pojav cistične higrome pri fetusu. Dokazano je namreč, da so nosečnosti, kjer se pojavi cistična higroma pri plodu v drugem in tretjem trimesečju, pogosto povezane z hidropsom ploda, oligohidramnizo ali intrauterino fetalno smrtjo (17). Najpogostejši vzroki za njen pojav so citogenetski: pri 44.4% fetusov s cistično higromo je bil ugotovljen kariotip 45, XO, pri dodatnih 23% je bila najdena mozaična oblika Turner sindroma (18). Zaradi dokazane statistično značilne povezanosti naj bi se tako vsem nosečnicam z ugotovljeno fetalno cistično higromo že v prvem trimestru nosečnosti omogočila prenatalna diagnostika s posebnim poudarkom na preverjanju spolnih kromosomov (18, 19).

Ker v Sloveniji in posledično v UKC Maribor še vedno velja citogenetska analiza za zlati standard dokazovanja kromosomskih anomalij, se metoda QF-PCR uporablja za preverjanje številčnosti kromosomov 13, 18 in 21 predvsem kot dopolnilni test, ki omogoča hitro preliminarno informacijo o številu preverjenih treh kromosomov. Samostojna številčna analiza vseh petih kromosomov: 13, 18, 21, X in Y z metodo QF PCR pa se v Sloveniji še ne izvaja. Ozirajoč se na lastne izkušnje naš pristop k preverjanju številčnosti vseh petih kromosomov hkrati temelji na selektivnem izboru oz. določitvi posameznih vzorcev, pri katerih obstaja povečano tveganje za pojav kromosomske aneuploidije spolnih kromosomov.

2. Materiali in metode

2.1. Metoda QF-PCR

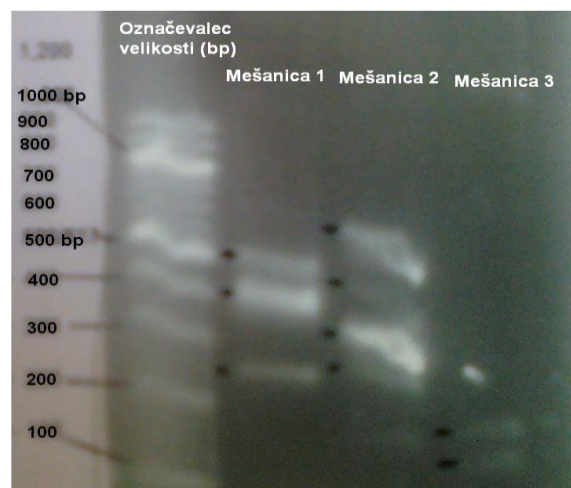
Genomsko DNA smo izolirali iz amniocit, horionskih resic, placentalnega tkiva ali periferne venske krvi s pomočjo komercialnega kompleta reagentov (Qiagene) po priloženih navodilih proizvajalca. Sledila je priprava reakcije QF-PCR v treh reakcijskih mešanicah, ki so vsebovale fluorescentno označene začetne oligonukleotide, specifične za genetske označevalce: sedem označevalcev smo izbrali s kromosoma X ter dva označevalca, značilna za oba spolna kromosoma v genu AMEL (tabela 1).

Tabela 1. Genetski označevalci, označeni s fluorescenčnimi barvili (Cy5, Cy5.5, D2) uporabljeni za določanje števila spolnih kromosomov pri dodatnem hitrem QF-PCR testu.

Mešanica 1	Mešanica 2	Mešanica 3
STRX1	PentaX15	AMEL1
PentaX16	PentaX12	AMELXY2
DXS6809	PentaX13	
	DXS6807	

Osnovni princip metode QF-PCR je predstavljen v predhodnem prispevku (Erjavec s sod., 2011). Pripravljene mešanice za reakcijo QF-PCR smo pomnožili v grelnem bloku za PCR (Eppendorf Mastercycler gradient, Biometra Gradient) pri nekoliko spremenjenih pogojih v primerjavi s predhodno objavljenimi: začetna denaturacija 15 min pri 95°C; sledil je cikel sestavljen iz 30 s pri 94°C, 1 min 30 s pri 63°C in 1 min pri 72°C. Za reakcijo 1 in 2 smo uporabili 27 ciklov, za reakcijo 3 pa 24 ciklov. Po končani reakciji QF-PCR v grelnem bloku smo izvedli kontrolno agarozno gelsko elektroforezo (AGEF) s 3% agaroznim gelom.

Nanašali smo po 3 µl PCR produkta in AGEF izvajali 10 min pri napetosti 160 V (slika 1).



Slika 1. Rezultat agarozne elektroforeze po opravljenem pomnoževanju mikrosatelitnih označevalcev s kromosoma X s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (QF-PCR). Mešanico devetih označevalcev pripravljamo v treh ločenih PCR-mešanicah; v prvi koloni je prikazan velikostni označevalec za DNA-fragmente, v drugi, tretji in četrti koloni pa so predstavljeni uspešno pomnoženi fragmenti po posameznih mešanicah.

Na osnovi rezultatov AGEF smo določali potrebno količino PCR produkta za kapilarno elektroforezo (KEF). KEF smo izvajali z Beckman Coulter CEQ 8000 sistemom za kapilarno elektroforezo, pri kateri za kvantitativno analizo enega vzorca uporabimo eno kapilarno. Kot rezultat KEF smo za vsakega preiskovanca dobili elektroforetogram, ki smo ga analizirali s pomočjo Excel računalniške programske opreme. Na vsakem elektroforetogramu smo identificirali mikrosatelitne genske označevalce.

Pri posameznem mikrosatelitnem označevalcu s kromosoma sta možni dve vrsti rezultata:

- za normalni informativni označevalec sta značilna dva vrhova s podobno fluorescenčno intenziteto in enako površino (razmerje 1:1); kar je **normalno heterozigotno stanje**, ki izključuje aneuploidijo;
- za neinformativni označevalec je značilen en vrh, kar pomeni **homozigotno stanje**, lahko pa pomeni tudi prisotno **monosomijo kromosoma**, če se to ponovi pri vseh testiranih označevalcih; v tem primeru aneuploidije ni mogoče izključiti.

Kot rezultat metode QF-PCR lahko pričakujemo naslednje možne vrste in število spolnih kromosomov v posameznem vzorcu:

Stanju **XX** ustreza:

- prisotna dva AMEL označevalca, vsak v homozigotnem stanju (en vrh)
- vsaj dva mikrosatelitna označevalca s kromosoma X prisotna v heterozigotnem stanju (dva vrhova s podobno fluorescenčno intenziteto in enako površino).

Stanju **XY** ustreza:

- prisotna dva AMEL označevalca, vsak v heterozigotnem stanju (po dva vrhova s podobno fluorescenčno intenziteto in enako površino)
- vsi mikrosatelitni označevalci s kromosoma X prisotni v homozigotnem stanju (en vrh).

Stanju **XO** ustreza:

- prisotna dva AMEL označevalca, vsak v homozigotnem stanju (en vrh)
- vsi mikrosatelitni označevalci s kromosoma X prisotni v homozigotnem stanju (en vrh).

Stanju **XXX** ustreza:

- prisotna dva AMEL označevalca, vsak v homozigotnem stanju (en vrh)
- dva/ trije aleli za posamezni mikrosatelitni označevalec s kromosoma X; v primeru dveh vrhov sta le-ta prisotna v različnih razmerjih; npr 2:1- če je en vrh večji od drugega v razmerju 2:1- verjetna **trisomija**.

Stanju **XXY** ustreza:

- prisotna dva AMEL označevalca, vsak v heterozigotnem stanju (dva vrhova) **IN** v različnem velikostnem razmerju;
- vsaj dva mikrosatelitna označevalca s kromosoma X prisotna v heterozigotnem stanju (dva vrhova s podobno fluorescenčno intenziteto in enako površino).

Stanju **YY** ustreza:

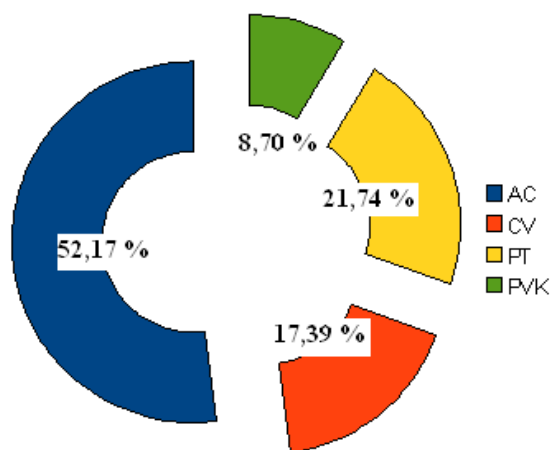
- prisotna dva AMEL označevalca, vsak v heterozigotnem stanju (dva vrhova) **IN** v različnem velikostnem razmerju;
- vsi mikrosatelitni označevalci s kromosoma X prisotni v homozigotnem stanju (en vrh).

V skladu z britanskimi smernicami za uporabo metode QF-PCR (16) kot diagnostične metode za zanesljivo identifikacijo aneuploidije v vzorcu, zadostujeta po dva informativna označevalca. V primeru premalo informativnih označevalcev se opravi razširjena analiza z dodatnimi označevalci ali z drugo metodo (npr. MLPA, kariotipizacija, sekveniranje).

2.2. Verifikacija metode QF-PCR za določanje številčnosti spolnih kromosomov

Izbor vzorcev

Opravili smo analizo 23 prenatalnih in postnatalnih vzorcev DNA z različno kvaliteto genomske DNA. Izmed analiziranih vzorcev je bila pri 12 vzorcih DNA izolirana iz amnijskih celic (AC), pri 4 iz horionskih resic (CV), pri 5 iz placentalnega tkiva (PT) in pri 2 iz periferne venske krvi (PVK) (slika 2). Pri vseh vzorcih je bil predhodno opravljen kariotip in najdene so bile različne številčne spremembe spolnih kromosomov.



Slika 2. Delež izhodišnih DNA vzorcev, uporabljenih v raziskavi (n=23).

Primerjava rezultatov QF-PCR s kariotipom

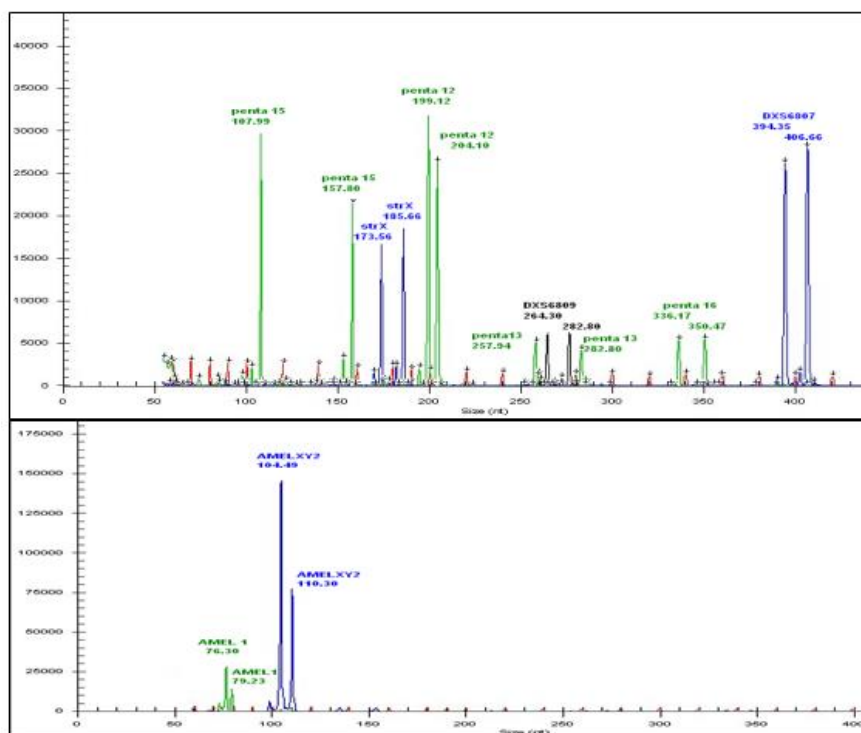
Vrsta in število sprememb na spolnih kromosomih nam pred testiranjem s QF-PCR nista bila znana. Število spolnih kromosomov v posameznem vzorcu smo

določili na podlagi števila dobljenih signalov iz elektroforetogramov posameznih vzorcev. Rezultate pridobljene po metodi QF-PCR smo primerjali z rezultati kariotipizacije pri istih vzorcih. Citogenetska analiza posameznih bioloških vzorcev različnega izvora (CV, PVK, AC, PT) je bila opravljena po standardnih protokolih Laboratorija za medicinsko genetiko UKC Maribor.

3. Rezultati

3.1. Rezultati določanja številčnosti spolnih kromosomov z metodo QF-PCR

Uspešnost treh PCR reakcij smo preverjali z agarozno elektroforezo. Z namenom priprave specifičnih vrhov za signale primerljivih velikosti, smo določali optimalno razmerje med količinami posameznega začetnega oligonukleotida v treh mešanich. Uspešno pomnožene reakcije po posameznih mešanich smo pri kapilarni elektroforezi združevali. Optimalno pridobljeno stanje po združevanju vzorcev na kapilarni elektroforezi je prikazano na sliki 3.



Slika 3. Elektroforetogram kot rezultat analize preiskovanja števila spolnih kromosomov s pomočjo mikrosatelitnih označevalcev s kapilarno elektroforezo; posamezni označevalec je prikazan z imenom, izbrano barvo ter označeno dolžino (bp), ki določa njegovo velikost. Zgornja slika prikazuje stanje mikrosatelitnih označevalcev s kromosoma X: vsi označevalci so v heterozigotnem stanju kar nakazuje na prisotna dva kromosoma X v vzorcu; spodnja slika prikazuje stanje AMEL- označevalcev: prisotna oba označevalca v heterozigotnem stanju ter razmerju 2:1; Pričakovano stanje spolnih kromosomov v vzorcu je XXY.

Izmed 23 opravljenih analiz smo v 21 (91,30 %) primerih našli odstopanje od normalnega števila spolnih kromosomov, v 2 (8,70 %) primerih odstopanja nismo zasledili (Tabela 2).

3.2. Verifikacija metode QF-PCR

Pri vseh vzorcih smo nato opravili primerjavo rezultatov QF-PCR z rezultati citogenetske analize-

Tabela 2. Analiza rezultatov hitrega testa z metodo QF-PCR za ugotavljanje številčnih anomalij kromosomov X in Y po posameznih vzorcih ter posameznih označevalcih.

Vzorec	AMEL1	AMELXY2	PentaX15	STRX1	PentaX12	PentaX13	DXS6809	PentaX16	DXS6807	QFPCR rezultat	Kariotip
019316	2 (1:2)	2 (1:2)	1	bs*	1	1	1	1	1	YYY	47,XXY
015030	1	1	2	1	1	3	2 (1:2)	1	bs*	XXX	47,XXX
020629	1	1	1	1	1	1	1	1	1	X0	45,X
017530	2(1:2)	2 (1:2)	1	1	1	1	1	1	1	XXY	47,XXY
019055	2	2	1	1	1	1	1	1	1	XY	47, XYY/ 46,XY/ 45, X
021829	2 (1:2)	2 (1:2)	2	1	1	1	2	1	1	XXY	47,XXY
011750	2 (1:2)	2 (1:2)	2(1:2)	2	2 (1:2)	1	2	2	1	XX/XXY	47,XXY
010450	2 (1:2)	2 (1:2)	1	1	1	2	2	1	1	XXY	47,XXY
012856	1	2 (1:2)	2	1	1	2	bs*	2	bs*	XXY	47,XXY
011018	2 (1:2)	2 (1:2)	1	1	2	1	1	1	1	XXY	47,XXY
011603	2 (1:2)	2 (1:2)	1	3	2 (1:2)	1	3	2 (1:2)	1	XX/XXY	47,XXY
010635	2 (1:2)	2 (1:2)	1	1	1	1	2	2	1	XXY	47,XXY
011604	2 (1:2)	2 (1:2)	2 (1:2)	2	1	1	1	2	1	XXY	47,XXY
010947	2	1	2	1	2	1	2	2	1	XXY	47,XXY
005220	2 (1:2)	2 (1:2)	2	2	2	2	1	2 (1:2)	1	XXY	47,XXY
004105	2 (1:2)	2	2	1	2	2	2	2 (1:2)	1	XXY	47,XXY
003056	2 (1:2)	2 (1:2)	2	1	2	2	2	1	1	XXY	47,XXY
004508	2 (1:2)	2 (1:2)	1	1	2	1	2	1	1	XXY	47,XXY
004530	2	2	1	1	1	1	1	1	1	XY	46,XY
000111	2 (1:2)	2 (1:2)	2	1	2	1	2	1	1	XXY	47,XXY
000620	2 (1:2)	2 (1:2)	2	2	1	2	1	1	1	XXY	47,XXY
000656	2 (1:2)	2 (1:2)	2	1	1	2	1	2	1	XXY	46,XY/ 47,XXY/48,XXXY
004844	2 (1:2)	2 (1:2)	2	2	2	1	2	1	1	XXY	47,XXY

bs* brez signala

Pri 65.2% (15/23) vzorcev so bili identificirani trije spolni kromosomi XXY (Klinefelterjev sindrom). Pri dveh vzorcih (8.7%; 2/23) smo prepoznali dodatni Y kromosom: XYY. V enem primeru (4.35%) na osnovi prisotnega enega označevalca v AMEL-genu ugotavljamo, da v tem vzorcu ni bilo prisotnega kromosoma Y, pri vseh X-označevalcih pa je bil prisoten samo en kromosom X (Turnerjev sindrom). Trije kromosomi X z AMEL-označevalcem, ki je nakazoval odsotnost Y kromosoma so bili določeni pri 4.35% (1/23) preiskovancev (XXX kariotip). V dveh primerih je bilo zaradi materine kontaminacije (mešanica materinega in plodovega genoma) porušeno razmerje med številom in identifikacijo spolnih kromosomov. Do pojava kontaminacije namreč lahko pride med postopkom odvzema materiala; to nam nakazuje vrsta izhodiščnega materiala ter specifična razporeditev genetskih označevalcev.

kariotipa. V 19/23 (82.6%) primerov se rezultata popolnoma ujemata. V dveh primerih (vzorca 019055 ter 00656) rezultat QF-PCR ni pokazal enakega izida kot kariotip: citogenetska analiza je pokazala, da je bil v obeh primerih prisoten mozaicizem in sicer 47,XXY/46,XY/45,X oziroma 46,XY/47,XXY/48,XXXY. Izstopata tudi vzorca 011750 ter 011603, pri katerih so bili identificirani 3 kromosomi X, kariotip pa je bil določen kot 47,XXY. To pojasnimo z hkratno prisotnostjo materinega in fetalnega genoma v istem vzorcu.

4. Razprava

Za namene prenatalne genetske diagnostike je klasični citogenetski ali molekularno citogenetski pristop še vedno predrag, poleg tega pa tudi časovno zamuden v primerjavi z novejšimi tehnikami, ki zagotavljajo hitrejše in cenejše rezultate (20, 2). Poleg tega so rezultati kariotipa odvisni od uspešnosti rasti celic v kulturi, na kar pa običajno ne moremo vplivati. Posebnega pomena je še

ustrezna kvaliteta kromosomov v preparatu. Celična kultura namreč lahko pripomore k selektivnosti uspešnejših celic v procesu in vitro celične proliferacije.

Medtem, ko s kariotipom dobimo vpogled v celotni genom preiskovanca, z novejšimi na PCR osnovanimi metodami preverjamo predvsem ciljno določene genetske segmente. Ocenjujejo, da je 96% kromosomskih sprememb pri fetusih z kromosomskimi napakami posledica numeričnih kromosomskih sprememb, najpogosteje na kromosomih 13, 15, 16, 18, 21, 22 ter kromosom X (1). Zato se je predvsem s hitrimi testi smiselno usmeriti na preiskovanje najpogostejših kromosomskih sprememb pri prenatalni genetski diagnostiki.

Predhodne študije so dokazale učinkovitost metode QF-PCR za preverjanje številčnosti **avtosomov** in QF-PCR se je izkazala kot zanesljiva dopolnilna metoda za nadomestilo dolgotrajne citogenetske analize pri prenatalnih vzorcih (2, 3). Po lastnih izkušnjah ter v skladu z evropskimi smernicami tako v LMG, UKC Maribor izvajamo osnovni hitri test z metodo QF-PCR za določanje številčnih sprememb kromosomov 13, 18 in 21 predvsem kot dopolnilo citogenetski analizi v primerih nosečnosti s povišanim tveganjem za rojstvo otroka s kromosomopatijo (6).

Z namenom identifikacije aneuploidij spolnih kromosomov tako v prenatalne kot tudi postnatalne namene pa so v razvoju še drugi tehnološki postopki, ki omogočajo hitrejši, ekonomsko ugodnejši ter obenem dovolj specifični in senzitivni rezultat (21, 22). Novejše molekularno-genetske metode za zgodnje prepoznavanje številčnih kromosomskih sprememb pri spolnih kromosomih temeljijo ali na specifičnem zaznavanju prisotnosti določenih genetskih označevalcev na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR) (23, 24) ali na kvantitativnem vrednotenju na osnovi DNA sekveniranja (22). Metoda QF-PCR za preverjanje številčnosti spolnih kromosomov se je dokazala kot zanesljiva tehnologija in se lahko izvaja hkrati z preverjanjem kromosomov 13, 18 in 21 ali pa samostojno, ker nam to omogoča lastnoročno razvit način dela.

Poleg 20 genetskih označevalcev za kromosome 13, 18, 21, ki jih vključujemo v osnovno testiranje s QF-PCR, smo v nabor označevalcev dodali še devet genetskih označevalcev za kromosoma X in/ali Y. Dodatno testiranje predstavlja za približno četrtno dražjo izvedbo v primerjavi z osnovno metodo QF-PCR in omogoča odločitev o tem ali bomo opravili testiranje števila kromosomov 13, 18 in 21 ali dodatno še kromosomov X in Y. Nekateri ultrazvočno opaženi fenotipski znaki fetusa namreč dobro korelirajo s pojavom aneuploidij na spolnih kromosomih (25, 26). Tako se na osnovi določenih fenotipskih znakov (ultrazvočna fetalna diagnostika) že

lahko usmerimo na tista kromosomska območja, kjer z večjo verjetnostjo pričakujemo nepravilnosti, in omogočimo natančnejše testiranje pri preiskovankah s povišanim tveganjem.

V skladu z britanskimi smernicami pa lahko sedaj pripravljeno kombinacijo hitrega testa QF-PCR za testiranje kromosomov 13, 18 in 21 ter dodatno še kromosomov X in Y ponudimo kot samostojni test, enako kot ga ponujajo na komercialnem tržišču. Večina komercialnih pripravkov za analizo prenatalnih kromosomskih sprememb (Devyser, ChromoQuant, Aneufast, itd) omogoča preverjanje števila vseh petih kromosomov že v prvi fazi. Po naših izkušnjah pa preiskovanje le-teh pri vseh vzorcih ni smiselno, niti ekonomsko ali etično opravičljivo. Testiranje označevalcev kromosoma Y naj bi se po evropskih priporočilih samostojno opravljalo le na posebno zahtevo naročnika.

Razvili in optimizirali smo metodo QF-PCR za testiranje kromosomov X in Y, poleg tega pa je bila opravljena tudi verifikacija metode. Na izbranem vzorcu 23 genomskih DNA s številčnimi spremembami spolnih kromosomov, ki so nam bile predhodno nepoznane, smo določali uporabnost dodatnega testa QF-PCR. Če ne upoštevamo kontaminacije z materinimi celicami (pri 8.7% vzorcev ali 2/23) in pojava mozaicizma v nizkih deležih (običajno pod 10%) (pri 8.7% vzorcev ali 2/23), je bilo ujemanje med rezultati QF-PCR in rezultati kariotipa 100%. Zaradi premajhnega deleža posameznih oblik celic z mozaikom, le-teh z uporabljeno na PCR osnovano tehnologijo nismo bili sposobni zaznati. Kontaminacije z materinimi celicami v nižjih odstotkih tudi kariotipizacija kot razmeroma subjektivno vrednotena tehnologija težje odkriva, še posebej v primerih fetusa ženskega spola. Z metodo QF-PCR je le-ta, če je le prisotna v dovolj velikem deležu, lažje odkrita in tako uporabljena za pojasnilo odklonov pri rezultatih (2).

Predstaviti smo želeli razširjen način uporabe že vpeljanega genetskega testiranja z metodo QF-PCR v diagnostičnem laboratoriju. Testiranje temelji na analizi genetskega materiala, pridobljenega z invazivnimi postopki za odvzem izhodiščnega materiala, s katerim je povezana povišana stopnja splavnosti (27). Neinvazivni genetski presejalni testi, ki omogočajo odkrivanje najpogostejših fetalnih aneuploidij iz materinega seruma, so se pojavili na trgu v zadnjih letih (28). V prihodnosti lahko pričakujemo postopni prehod na čim manj invazivne postopke za odvzem fetalnega genetskega materiala ter na tehnologijo, ki bo na takih vzorcih omogočala detekcijo genetskih anomalij pri fetusu. Današnje poznavanje diagnostično uporabne tehnologije ter naše izkušnje z njo bomo lahko uporabili za nadaljnje

razvijanje novih postopkov, ki bodo čim natančneje, hitreje ter zanesljivo doprinesli k zmanjšanju števila rojstev s prirojenimi napakami zaradi genetskega vzroka.

5. Zaključek

Uspešno smo razvili dodatno metodo QF-PCR, s katerim lahko naenkrat analiziramo 27 genetskih označevalcev s kromosomov 13, 18, 21, X in Y. Metoda nam omogoča izvedbo ciljne diagnostike za preverjanje številčnih kromosomskih sprememb na spolnih kromosomih ali pa jo lahko uporabimo kot samostojni hitri test za ugotavljanje najpogostejših kromosomskih aneuploidij. Čeprav je testiranje z dodatnim naborem genetskih označevalcev še vseeno cenovno dovolj ugodno v primerjavi z dražjimi citogenetskimi metodami, tovrstno testiranje v Laboratoriju za medicinsko genetiko UKC Maribor izvajamo le v posebnih primerih.

Zahvala

Za izvedbo verifikacije metode v okviru strokovne prakse se zahvaljujemo študentu Simonu Pintariču. Avtorji članka se zahvaljujemo tudi vsem ostalim, sedanjim in bivšim sodelavcem Laboratorija za medicinsko genetiko, Klinike za ginekologijo in perinatologijo, UKC Maribor.

Reference

- Hultén MA, Dhanjal S, Pertl B. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction* 2003 Sep;126 (3): 279-97.
- Mann K, Hills A, Donaghue C, Thomas H, Ogilvie CM. Quantitative fluorescence PCR analysis of >40,000 prenatal samples for the rapid diagnosis of trisomies 13, 18 and 21 and monosomy X. *Prenat Diagn.* 2012 Dec; 32 (12): 1197 - 204.
- Cirigliano V, Voglino G, Ordoñez E, Marongiu A, Paz Cañadas M et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. *Prenat Diagn.* 2009 Jan; 29(1): 40-9.
- Hills A, Donaghue C, Waters J, Waters K, Sullivan C, et al. QF-PCR as a stand-alone test for prenatal samples: the first 2 years' experience in the London region. *Prenat Diagn.* 2010 Jun; 30 (6): 509-17.
- Driscoll DA, Gross S. Clinical practice. Prenatal screening for aneuploidy. *N Engl J Med.* 2009 Jun 11; 360 (24): 2556-62.
- Skerget AE, Herodež SS, Zagorac A, Zagradišnik B, Mujezinović F, Vokač NK. Slovenian Five-Year Experiences with Rapid Prenatal Diagnosis of Common Chromosome Aneuploidies Using Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013 Jun 20.
- Erjavec Škerget A, Stangler Herodež Š, Zagradišnik B, Kokalj Vokač N. Kvantitativna fluorescenčna verižna reakcija s polimerazo (QF-PCR) kot alternativni test za hitro prenatalno genetsko testiranje *Anali PAZU* 2011, letn. 1, št. 1, str. 62-66.
- Lewin P, Kleinfinger P, Bazin A, Mossafa H, Szpiro-Tapia S. Defining the efficiency of fluorescence in situ hybridization on uncultured amniocytes on a retrospective cohort of 27407 prenatal diagnoses. *Prenat Diagn.* 2000 Jan;20(1):1-6.
- Bouchlariotou S, Tsikouras P, Dimitraki M, Athanasiadis A, Papoulidis I, et al. Turner's syndrome and pregnancy: has the 45,X/47,XXX mosaicism a different prognosis? Own clinical experience and literature review. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011 May; 24(5):668-72.
- Leggett V, Jacobs P, Nation K, Scerif G, Bishop DV. Neurocognitive outcomes of individuals with a sex chromosome trisomy: XXX, XYY, or XXY: a systematic review. *Dev Med Child Neurol.* 2010 Feb;52 (2) :119-29.
- Hofherr SE, Wiktor AE, Kipp BR, Dawson DB, Van Dyke DL. Clinical diagnostic testing for the cytogenetic and molecular causes of male infertility: the Mayo Clinic experience. *J Assist Reprod Genet.* 2011 Nov; 28 (11):1091-8.
- Tartaglia NR, Howell S, Sutherland A, Wilson R, Wilson L. A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet J Rare Dis.* 2010 May 11;5:8.
- Bojesen A, Juul S, Gravholt CH. Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Feb;88(2):622-6.
- Stochholm K, Juul S, Gravholt CH. Diagnosis and mortality in 47,XYY persons: a registry study. *Orphanet J Rare Dis.* 2010 May 29;5:15.
- Visootsak J, Graham JM Jr. Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. *Orphanet J Rare Dis.* 2006 Oct 24;1:42.
- <http://www.cmgs.org/BPGs/pdfs/20currentbpgs/QFPCR.pdf> Association for Clinical

- Cytogenetics and Clinical Molecular Genetics Society. QF-PCR for the diagnosis of aneuploidy best practice guidelines (2012) v.3.0
17. Chen CP, Liu FF, Jan SW, Lee CC, Town DD, Lan CC. Cytogenetic evaluation of cystic hygroma associated with hydrops fetalis, oligohydramnios or intrauterine fetal death: the roles of amniocentesis, postmortem chorionic villus sampling and cystic hygroma paracentesis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1996 May;75(5):454-8.
 18. Alpmann A, Cogulu O, Akgul M, Arıkan EA, Durmaz B, et al. Prenatally diagnosed Turner syndrome and cystic hygroma: incidence and reasons for referrals. *Fetal Diagn Ther.* 2009;25(1):58-61.
 19. Shulman LP, Emerson DS, Felker RE, Phillips OP, Simpson JL, Elias S. High frequency of cytogenetic abnormalities in fetuses with cystic hygroma diagnosed in the first trimester. *Obstet Gynecol.* 1992 Jul;80(1):80-2.
 20. Gekas J, van den Berg D, Durand A, Vallée M, Wildschut HIJ, Bujold E, et al. Rapid testing versus karyotyping in Down's syndrome screening: cost-effectiveness and detection of clinically significant chromosome abnormalities. *Eur J Hum Genet* 2010; 19(1):3-9.
 21. Allingham-Hawkins DJ, Chitayat D, Cirigliano V, Summers A, Tokunaga J, et al. Prospective validation of quantitative fluorescent polymerase chain reaction for rapid detection of common aneuploidies. *Genet Med.* 2011 Feb;13(2):140-7.
 22. Hager K, Jennings K, Hosono S, Howell S, Gruen JR, et al. Molecular diagnostic testing for Klinefelter syndrome and other male sex chromosome aneuploidies. *Int J Pediatr Endocrinol.* 2012 Apr 23; (1):8.
 23. Kleinheinz A, Schulze W. Klinefelter's syndrome: new and rapid diagnosis by PCR analysis of XIST gene expression. *Andrologia.* 1994 May-Jun;26(3):127-9.
 24. Ottesen AM, Garn ID, Aksglaede L, Juul A, Rajpert-De Meyts E. A simple screening method for detection of Klinefelter syndrome and other X-chromosome aneuploidies based on copy number of the androgen receptor gene. *Mol Hum Reprod.* 2007 Oct;13(10):745-50.
 25. Nicolaidis K, Shawwa L, Brizot M, Snijders R. Ultrasonographically detectable markers of fetal chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1993 Jan 1;3(1):56-69.
 26. Cullen MT, Gabrielli S, Green JJ, Rizzo N, Mahoney MJ. Diagnosis and significance of cystic hygroma in the first trimester. *Prenat Diagn.* 1990 Oct;10(10):643-51.
 27. Mujezinovic F, Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2007 Sep;110(3):687-94. Review. *Obstet Gynecol.* 2008 Mar;111(3):779.
 28. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997 Aug 16;350(9076):485-7.