

Szybka diagnostyka najczęstszych aneuploidii u płodu metodą QF-PCR – analiza 100 przypadków

Rapid diagnosis of the most common fetal aneuploidies with the QF-PCR method – a study of 100 cases

Izabela Łaczmajska^{1,2}, Justyna Gil^{1,2}, Agnieszka Stembalska^{1,2}, Izabela Makowska^{1,2}, Joanna Kozłowska^{1,2}, Paweł Skiba^{1,2}, Halina Czermazowicz^{1,2}, Karolina Pesz^{1,2}, Ryszard Słęczak^{1,2}, Robert Śmigiel², Aleksandra Jakubiak^{1,2}, Anna Doraczyńska-Kowalik^{1,2}, Maria M. Sasiadek^{1,2}

¹ Katedra i Zakład Genetyki, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska

² Poradnia Genetyczna Fundacji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Polska

Streszczenie

Cel pracy: W ciągu ostatnich lat wprowadzono nowe techniki do szybkiej diagnostyki aneuploidii u płodu. Jedną z takich technik jest QF-PCR oparta na analizie wybranych kilkudziesięciu różnych polimorficznych markerów STR. Dla badanych aneuploidii specyficzność metody QF-PCR oceniana jest na 99,97%.

Celem pracy była ocena czy metodę QF-PCR z zastosowaniem komercyjnego zestawu można stosować jako jedyną do diagnostyki prenatalnej w przypadku występowania wysokiego ryzyka aneuploidii chromosomów 13, 18, 21, X i Y, z pominięciem hodowli komórkowych i pełnej analizy cytogenetycznej chromosomów.

Materiał i metody: Materiał do badania stanowił DNA wyizolowany z amniocytów (94 przypadki) i komórek trofoblastu (6 przypadków). Badanie metodą QF-PCR przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta testu. Rozdział produktów reakcji prowadzono z zastosowaniem sekwenatora ABI 310 Genetic Analyser, a analizę uzyskanych wyników wykonano przy użyciu oprogramowania GeneMarker.

Wyniki: Wyniki badania QF-PCR uzyskano w 95 przypadkach na 100 badanych (95%). Nieprawidłowe wyniki stwierdzono u 28 pacjentek (29,5%), w 5 przypadkach nie otrzymano wyniku. Wszystkie wyniki zostały potwierdzone w późniejszej analizie cytogenetycznej. Prawidłowe wyniki badania QF-PCR uzyskano u 67 pacjentek (70,5%). W grupie tej stwierdzono jednak w badaniu cytogenetycznym trzy nieprawidłowe wyniki nie dotyczące chromosomów analizowanych metodą QF-PCR. Ponadto dwa nieprawidłowe i trzy prawidłowe wyniki stwierdzono w badaniu cytogenetycznym u pacjentek, u których nie uzyskano wyniku badania QF-PCR.

Wnioski: QF-PCR jest szybką i wiarygodną metodą badania aneuploidii chromosomowych i może być stosowana jako jedyna z pominięciem pełnej analizy kariotypu, jednak tylko w przypadkach podejrzenia u płodu trisomii 13, 18, 21, lub aberracji liczbowych chromosomu X. W pozostałych sytuacjach pacjentce powinno być oferowane badanie kariotypu płodu z komórek uzyskanych po hodowli.

Słowa kluczowe: **aneuploidie / diagnostyka prenatalna / QF-PCR /**

Adres do korespondencji:

Agnieszka Stembalska
Katedra i Zakład Genetyki, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Marcinkowskiego 1, 50-368 Wrocław, Polska
tel.: 71 784 12 56, fax: 71 784 00 63
agnieszka.stembalska@umed.wroc.pl

Otrzymano: 03.03.2015
Zaakceptowano do druku: 01.04.2015

Izabela Łaczmajska et al. Szybka diagnostyka najczęstszych aneuploidii u płodu metodą QF-PCR – analiza 100 przypadków.

Abstract

Objectives: Recently, new techniques for rapid diagnosis of fetal aneuploidy have been introduced into clinical practice. One of these is QF-PCR, based on the analysis of several polymorphic markers, STRs. The specificity of the QF-PCR method is estimated at about 99.97%.

The aim of the study was to assess whether commercial kit QF-PCR can be used as the only method for rapid prenatal diagnosis of chromosomes 13, 18, 21, X and Y aneuploidies, omitting cell culture and complete cytogenetic analysis of fetal chromosomes.

Material and methods: DNA from amniocytes (94 cases) and trophoblast cells (6 cases) was analyzed with QF-PCR according to the manufacturer's protocol. The obtained products were separated using ABI 310 Genetic Analyzer and the resulting data were analyzed using GeneMarker software.

Results: The results of QF-PCR were obtained in 95 out of 100 cases (95%). Abnormalities were found in 28 cases (29.5%). All these results were confirmed in subsequent cytogenetic analysis. Normal results were obtained in 67 patients (70.5%). However, in that group, we found three chromosomal aberrations other than those analyzed by QF-PCR. Additionally, two abnormal and three normal karyotypes were found in patients with inconclusive QF-PCR results.

Conclusions: QF-PCR is a fast and reliable tool for chromosomal aneuploidy analysis and can be used as the only method without a full analysis of the karyotype, but only in cases of suspected fetal 13, 18, 21 trisomy or numerical aberrations of X chromosome. In other cases, fetal karyotype analysis from cells obtained after cell culture should be offered to the patient.

Key words: **aneuploidy / prenatal diagnosis / QF-PCR /**

Wstęp

Polskie Towarzystwo Ginekologiczne rekomenduje przeprowadzenie u każdej kobiety w ciąży nieinwazyjnych badań przesiewowych prenatalnych w kierunku najczęstszych wad rozwojowych i aberracji chromosomowych płodu. Postępowanie takie pozwala na wyłonienie grupy pacjentek mających podwyższone ryzyko wystąpienia wyżej wymienionych nieprawidłowości płodu [1].

Jednym ze wskazań do wykonania inwazyjnego badania prenatalnego jest podejrzenie aneuploidii, tj. aberracji liczbowej chromosomów płciowych lub autosomalnych. Aneuploidie są najczęściej występującymi zmianami genetycznymi u płodów. Stwierdza się je w około 60% samoistnych poronień, w 6% martwych urodzeń oraz u 0,6% żywo urodzonych dzieci [2].

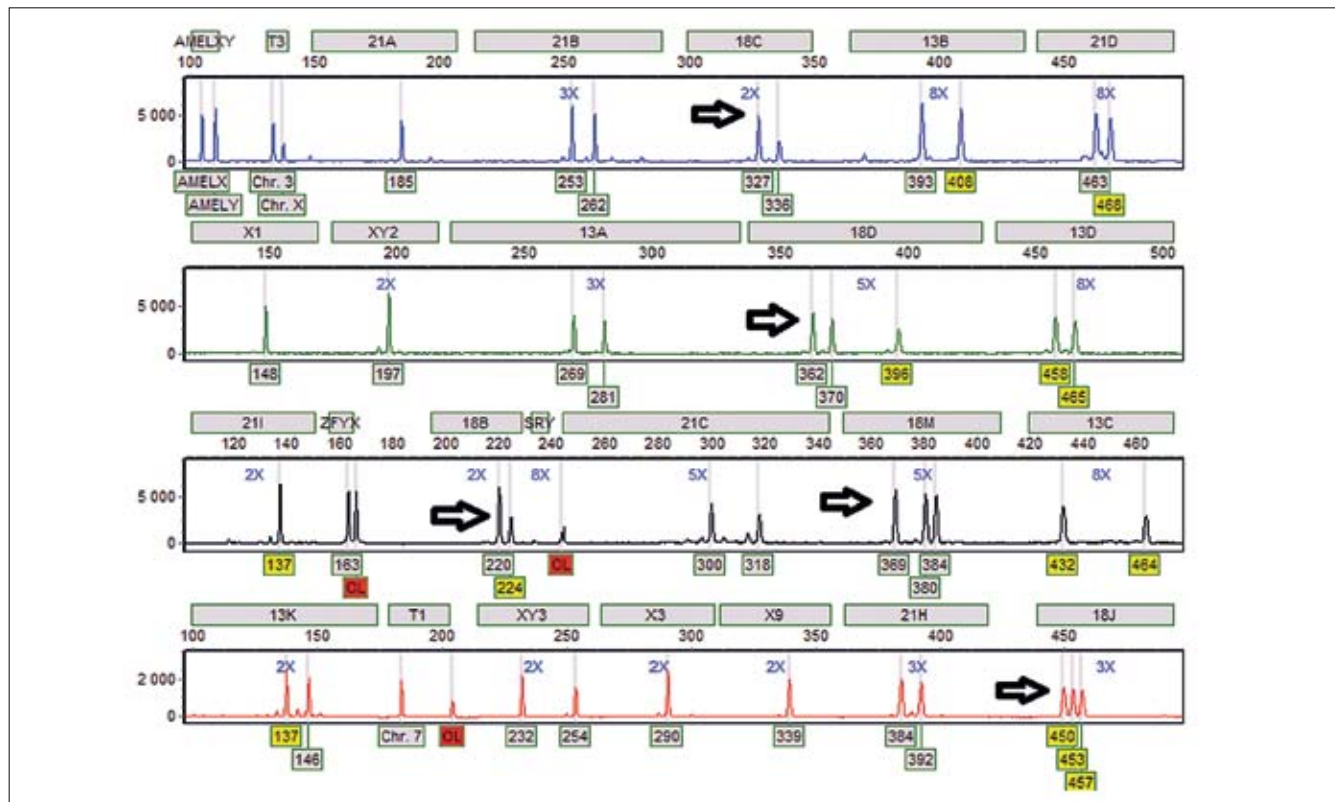
Inwazyjne badania prenatalne polegają na pobraniu materiału zawierającego komórki płodu: amniocyty, komórki trofoblastu (kosmówki) lub limfocyty krwi pępowinowej. Materiał ten może być wykorzystany do wykonania badań cytogenetycznych i/lub molekularnych. Badanie cytogenetyczne, czyli ocena kariotypu płodu, wymaga założenia hodowli komórkowych w celu uzyskania chromosomów (widoczne na etapie podziału komórkowego: metafazy). Standardowo do analizy aberracji liczbowych i strukturalnych chromosomów stosowane są metody cytogenetyki klasycznej (barwienie i prążkowanie chromosomów). Badania takie są kosztowne, pracochłonne i długotrwałe. W przypadku amniopunkcji czy biopsji komsówki trwają średnio około 2-3 tygodni, a w przypadku krwi pępowinowej od 3 do 10 dni [3].

W ciągu ostatnich kilkunastu lat wprowadzono nowe, szybkie techniki do diagnostyki najczęstszych aneuploidii chromosomowych płodu [4]. Pozwalają one na znaczne skrócenie czasu oczekiwania na wynik badania (zwykle do 24-48 godzin), obniżenie kosztów badania i zmniejszenie nakładu pracy. Do technik tych należy Rapid-FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*,

hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ*), który wykonywany jest na niehodowanych jądrach komórkowych wyizolowanych bezpośrednio po pobraniu materiału płodowego. Inne, jak QF-PCR (*Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction*), ilościowa fluorescencyjna reakcja polimerazy), BoBs (BACs-on-Beads, sztuczne chromosomy bakteryjne na mikrokulkach) czy technika MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, multipleksowa amplifikacja sond zależna od ligacji) przeprowadza się na DNA wyizolowanym z niehodowanych komórek płodu. Do metod tych, z wyjątkiem MLPA, dostępne są odczynniki z certyfikatem CE i IVD (*Conformité Européenne, in Vitro Diagnostic Medical Device*), co oznacza, że spełniają wymagania dyrektyw Unii Europejskiej [5].

Metoda QF-PCR oparta jest na analizie wybranych kilkadziesiąt różnych polimorficznych markerów STR (*short tandem repeats* – krótkie powtórzenia tandemowe). Obecne są one we wszystkich chromosomach i występują zawsze w dwóch kopiach (w dwóch *loci* w chromosomach homologicznych), dziedziczonych po jednej od każdego z rodziców. Markery STR jednej pary mogą być jednakowej lub różnej długości (różna liczba powtórzeń) [6]. DNA płodu wykorzystywany jest do przeprowadzenia reakcji PCR, w której sekwencje STR ulegają namnożeniu przy użyciu znakowanych fluorescencyjnie starterów. Detekcja fluorescencji produktów PCR odbywa się podczas elektroforezy kapilarnej na sekwenatorze. Analiza ilościowa i jakościowa markerów STR, zlokalizowanych w obrębie badanych chromosomów, pozwala na określenie ich liczby. Wynik badania uznawany jest za pewny, jeśli co najmniej dwa markery dla danego chromosomu są informatywne, czyli heterozygotyczne (różnej długości). Pozostałe markery mogą być nieinformatywne, czyli pojedyncze. Obecność pojedynczych markerów STR wynika z faktu odziedziczenia jednakowych kopii od obojga rodziców, pacjent jest homozygotą w stosunku do takich markerów [7].

Izabela Łączmańska et al. Szybka diagnostyka najczęstszych aneuploidii u płodu metodą QF-PCR – analiza 100 przypadków.



Rycina 1. Picture of collagen staining using Picro-Cirius red. 200x magnification.

Panel markerów STR, dedykowany do badania aneuploidii, obejmuje chromosomy: 13, 18, 21, X i Y. Stwierdzenie obecności 3 kopii sekwencji dla badanych markerów danego chromosomu oznacza rozpoznanie u płodu trisomii tego chromosomu. (Rycina 1). Natomiast obecność pojedynczych sekwencji dla wszystkich badanych markerów danego chromosomu oznacza rozpoznanie jego monosomii u płodu (dotyczy to najczęściej chromosomu X). Metoda QF-PCR umożliwia także diagnostykę triploidii u płodu. W takim przypadku wszystkie badane markery występują w trzech kopiach. QF-PCR pozwala również na wykrycie obecności dwóch linii komórkowych o różnym kariotypie (mozaicyzm) na poziomie >15% [4, 5, 7, 8].

Standardy wykonywania metody QF-PCR są ściśle określone. Do badania należy używać jedynie DNA wyizolowanego z:

- komórek płynu owodniowego, lub
- komórek trofoblastu (powyższy materiał nie może zawierać krwi lub innych tkanek kobiety ciężarnej), lub
- limfocytów krwi pępowinowej (niezawierającej domieszki krwi ciężarnej). W przeciwnym wypadku istnieje ryzyko częściowej lub całkowitej kontaminacji materiałem pochodzenia matczynego.

Cel pracy

Celem pracy była ocena czy metodą QF-PCR z wykorzystaniem zestawu Devyser Compact v3 CE IVD (Devyser) można stosować jako jedyną, w przypadku występowania wysokiego ryzyka aneuploidii chromosomów 13, 18, 21, X i Y, z pominięciem hodowli komórkowych i pełnej analizy cytogenetycznej chromosomów.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowił DNA wyizolowany z amniocytów (94 przypadki) i komórek trofoblastu (6 przypadków). Materiał został pobrany w szpitalach i klinikach ginekologicznych Dolnego Śląska i województwa opolskiego. Średni wiek kobiet w ciąży poddanych inwazyjnemu badaniu prenatalnemu wynosił 34,5 lat ($\pm 5,2$), z czego 47 kobiet (47%) było w wieku 19-34 lata, 37 (37%) w wieku 35-39 lat, a 16 (16%) w wieku 40-46 lat. Płyn owodniowy był pobierany pomiędzy 15 a 19 tygodniem ciąży a w dwóch przypadkach w 20 i 23 tygodniu ciąży. Wskazania do badań prenatalnych przedstawiono w tabeli I.

Każdorazowo po pobraniu płynu owodniowego lub komórek trofoblastu:

- 1) izolowano DNA i przeprowadzono szybkie badanie QF-PCR oraz
- 2) zakładano po 2 hodowle komórkowe w celu wykonania analizy chromosomów metodami cytogenetyki klasycznej.

Isolację DNA z amniocytów i komórek trofoblastu wykonano z użyciem zestawu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) zgodnie z instrukcją producenta, wykorzystując do izolacji odpowiednio: 2-3 ml płynu owodniowego lub 2-3 wypreparowane kosmki. Do badania kwalifikowano tylko klarowny płyn owodniowy bez zawartości krwi (zgodnie z wymaganiami producenta testu Devyser).

Badanie metodą QF-PCR zostało prowadzone zgodnie z instrukcją producenta testu Devyser Compact v3 CE IVD (Devyser). Za każdym razem analizowano w sumie 26 różnych sekwencji STR dla następujących chromosomów: 13 (5

Izabela Łaczmajska et al. Szybka diagnostyka najczęstszych aneuploidii u płodu metodą QF-PCR – analiza 100 przypadków.

Tabela I. Zestawienie wskazań do badania inwazyjnego.

Wskazanie do badania	Wyniki nieprawidłowe (QF-PCR i/lub cytogenetyka)	Wyniki prawidłowe (QF-PCR i/lub cytogenetyka)	Wszystkie wyniki
Test*, ryzyko >1:50 + NT>95c + wady w USG	10	2	12
Test*, ryzyko >1:50 + NT>95c	7	6	13
Test*, ryzyko >1:50 + USG	3	5	8
Test*, ryzyko 1:50-1:300 + NT>95c	-	5	5
Test*, ryzyko 1:50-1:300 + USG	2	4	6
Tylko NT>95c	2	6	8
Tylko test*, ryzyko >1:50	2	10	12
Tylko test*, ryzyko 1:50-1:300	-	15	15
Tylko wady w USG	5	5	10
Tylko wady płodu we wcześniejszej ciąży	-	2	2
Nieprawidłowy NIPT	1	-	1
Tylko wiek >35 lat	1	4	5
Brak danych	-	3	3
RAZEM	33	67	100

* test połączony I trymestru (combined test) – połączona ocena danych z USG i z testu biochemicznego z krwi (poziom wolnej podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej i białka ciążowego PAPP-A)

Tabela II. Wyniki badania QF-PCR i badania cytogenetycznego.

Wyniki badania	QF-PCR	Cytogenetyka klasyczna
+21	12	14
+18	7	7
+13	4	4
monosomia X	4	4
XXY	1	1
RAZEM	28 (29,5%)	30 (30,3%)
prawidłowy żeński	35	36
prawidłowy żeński + nieprawidłowe badanie cytogenetyczne	1	1 46,XX,del(4)(p15.2)
prawidłowy męski	29	30
prawidłowy męski + nieprawidłowe badanie cytogenetyczne	2	2 47,XY,+9 mos 46,XY/47,XY,+mar
RAZEM	67* (70,5%)	69 (69,7%)
brak wyniku/nieinformatywny (kontaminacja)	5**	1 (QF-PCR prawidłowy męski)
RAZEM	100	100

* w tym 3 przypadki z nieprawidłowym badaniem cytogenetycznym, gdzie zmiana nie dotyczyła chromosomów badanych metodą QF-PCR

** w tym 2 wyniki nieprawidłowe z trisomią 21, 2 wyniki prawidłowe męskie, 1 wynik prawidłowy żeński

Izabela Łaczmarska et al. Szybka diagnostyka najczęstszych aneuploidii u płodu metodą QF-PCR – analiza 100 przypadków.

markerów), 18 (5 markerów), 21 (6 markerów), X (7 markerów), Y (5 markerów) oraz czterech fragmentów kontrolnych (na chromosomach X, 3 i 7).

Produkty reakcji PCR były rozdzielane w czasie elektroforezy kapilarnej przy użyciu sekwenatora ABI 310 Genetic Analyser z oprogramowaniem GeneScan Analysis software version 3.1.2 (Applied Biosystems) z zastosowaniem POP-4 Polymer (Applied Biosystems) oraz standardu wielkości LIZ 500 size standard (Applied Biosystems). Analizę uzyskanych produktów PCR (ich liczby i wielkości) wykonano przy użyciu oprogramowania GeneMarker software version 1.85 (SoftGenetics LLC) zgodnie z wytycznymi producenta testu Devyser Compact v3.

Badanie cytogenetyczne przeprowadzono według klasycznych metod, z dwóch niezależnych hodowli [9]. W każdym przypadku analizowano standardowo po 15 metafaz łącznie z obu hodowli, z rozdzielczością prążkową co najmniej 300 prążków.

Wyniki

Wyniki badania QF-PCR uzyskano w 95 na 100 badanych przypadków (95%) – tabela II.

W pięciu przypadkach nie uzyskano wyniku ze względu na: 1) zbyt małą ilość i słabą jakość DNA wyizolowanego z amniocytów – dwa przypadki (w badaniu cytogenetycznym: prawidłowy kariotyp męski i żeński) lub 2) obecność dodatkowego profilu DNA (wynik nieinformatywny, kontaminacja materiałem pacjentki) – trzy przypadki (w badaniu cytogenetycznym odpowiednio: a) prawidłowy kariotyp męski, b) i c) kariotyp męski z trisomią 21).

Nieprawidłowe wyniki QF-PCR stwierdzono u 28 pacjentek (29,5%). Wśród nieprawidłowych wyników trisomię chromosomu 21 zdiagnozowano u 12 płodów (12,6%), trisomię chromosomu 13 u 4 płodów (4,2%), trisomię chromosomu 18 u 7 płodów (7,4%), monosomię chromosomu X u 4 płodów (4,2%) a trisomię chromosomów płciowych (XXY) u 1 płodu (1,1%). Wszystkie wyniki zostały potwierdzone w późniejszej analizie cytogenetycznej (100% powtarzalności wyników nieprawidłowych).

Prawidłowe wyniki badania QF-PCR uzyskano u 67 płodów (70,5%), 36 płodów płci żeńskiej i 31 płodów płci męskiej. We wszystkich przypadkach wynik badania QF-PCR został potwierdzony badaniem cytogenetycznym (brak aneuploidii chromosomów 13, 18, 21, X i Y). W grupie tej stwierdzono jednak 3 nieprawidłowe wyniki niezwiązane z chromosomami analizowanymi metodą QF-PCR:

- 1) delecję na chromosomie 4 [kariotyp 46,XX,del(4)(p15.2)],
- 2) kariotyp mozaikowy z obecnością chromosomu markerowego [mos 47,XY,+mar/46,XY],
- 3) trisomię chromosomu 9 [kariotyp 47,XY,+9].

W jednym przypadku nie uzyskano wyniku badania kariotypu płodu (brak wzrostu hodowli komórek); w tym przypadku nie zweryfikowano prawidłowego wyniku (płec męska) uzyskanego w badaniu QF-PCR.

Dyskusja

Uzyskanie wyniku inwazyjnego badania prenatalnego w odpowiednio krótkim czasie ma istotne znaczenie ze względu na wysoki niepokój kobiety, towarzyszący oczekiwaniu na wynik, ale także możliwość podejmowania decyzji o kontynuacji lub wcześniejszym zakończeniu ciąży w przypadku stwierdzenia

ciężkiego i nieodwracalnego uszkodzenia płodu lub choroby zagrażającej jego życiu. Zgodnie z obowiązującymi w Polsce regulacjami prawnymi, tj. „Ustawą o planowaniu rodziny, ochronie płodu ludzkiego i warunkach dopuszczalności przerywania ciąży”, przedwczesne zakończenie ciąży możliwe jest w takich przypadkach do momentu osiągnięcia przez płód zdolności do samodzielnego życia [10].

Wieloośrodkowe badania z różnych krajów, obejmujące grupę kilkudziesięciu tysięcy pacjentek w ciąży, jednoznacznie wskazują na wysoką specyficzność i czułość techniki QF-PCR. Udowodniono, że w zakresie badanych aneuploidii QF-PCR ma stu procentową skuteczność [3, 4, 7, 11]. Uzyskane przez nas wyniki są zgodne z danymi literaturowymi, co potwierdza wysoką użyteczność tej metody także w polskich warunkach.

Dostępne obecnie na rynku zestawy do QF-PCR posiadają certyfikaty jakości CE i IVD, zatem mogą one być stosowane zgodnie z polskim prawem do diagnostyki bez konieczności przeprowadzania pełnej walidacji metody [12]. Nie bez znaczenia jest oprócz czasu uzyskania wyniku, sposób wykonania badania. Jest to tak zwany test jednoprobówkowy (*one-tube test*). Stosunkowo nieskomplikowana jest także interpretacja uzyskanych danych z wykorzystaniem odpowiedniego oprogramowania komputerowego.

Warunkiem otrzymania wiarygodnego wyniku QF-PCR jest odpowiednia jakość DNA. W dwóch przypadkach przeprowadzonych przez nas badań nie uzyskano wyniku QF-PCR z powodu złej jakości DNA (parametry A280/A260 poniżej 1,7), wyizolowanego z płynu owodniowego, a w trzech wynik był nieinformatywny – kontaminacja materiałem pacjentki. Przypadki kontaminacji są jednak rzadkie, jeśli do badania stosuje się tylko klarowny płyn owodniowy, dobrze wypreparowaną kosmówkę lub krew płodu o potwierdzonym pochodzeniu (badanie poziomu hemoglobiny płodowej). Ogranicza się w ten sposób do minimum ryzyko kontaminacji próbki uzyskanej od płodu w fazie przedanalizy [4].

Ograniczeniem metody QF-PCR jest jej ukierunkowanie jedynie na najczęstsze aneuploidie chromosomowe. Uniemożliwia to wykrycie u płodu innych aberracji chromosomowych. W naszych badaniach sytuacja taka miała miejsce w trzech przypadkach (3,16%). Niemniej w każdym z nich, oprócz podwyższonego ryzyka trisomii chromosomowych (ryzyko >1:300), w badaniu USG stwierdzono także wady płodu, jak 1) brak kości nosowej (NB), rozszczep wargi, ognisko hiperechogenne w sercu, 2) liczne wady rozwojowe 3) podejrzenie przepukliny przeponowej, małozuchwie. W dwóch ostatnich przypadkach zaobserwowano także zwiększoną przezierność karkową płodu – NT (*nuchal translucency*) powyżej 95 centyla.

Wyżej wymienione sytuacje dowodzą, że zlecenie badania QF-PCR powinno następować tylko w ściśle określonych przypadkach, gdy wskazaniem do badania jest tylko wiek ciężarnej i/lub wyniki testów przesiewowych wskazujące na wysokie ryzyko wystąpienia u płodu aberracji liczbowych chromosomów 13, 18, 21 i X. W przypadku, gdy stwierdzane są wady płodu w badaniu USG (w tym NT>3,5 mm) lub wywiad rodzinny obciążony jest aberracją, dotyczącą innych chromosomów niż badane, konieczna jest pełna analiza kariotypu płodu [7]. Dodatkowo zaleca się, w przypadku stwierdzenia u płodu trisomii w badaniu QF-PCR, wykonanie pełnej analizy cytogenetycznej lub badania cytogenetycznego u rodziców

Izabela Łacmańska et al. Szybka diagnostyka najczęstszych aneuploidii u płodu metodą QF-PCR – analiza 100 przypadków.

w celu wykluczenia nosicielstwa translokacji robertsonowskiej [7, 13]. Ma to istotne znaczenie z punktu widzenia poradnictwa genetycznego.

Zaletą badania QF-PCR, w porównaniu do techniki MLPA, czy BoBs jest możliwość odróżnienia mozaikowości u płodu od kontaminacji materiałem pacjentki. Wykonanie profilu STR dla ciężarnej i porównanie wyniku z wynikiem płodu, w którym stwierdzono dodatkowy profil markerów STR lub wynik prawidłowy żeński pozwala na jednoznaczne stwierdzenie obecności w badanym materiale DNA ciężarnej, czego nie umożliwiają pozostałe metody molekularne, oparte na badaniu innych fragmentów genomu [5, 6, 13].

Inwazyjne genetyczne badania prenatalne mają na celu ustalenie, jaka zmiana w genomie płodu odpowiada za obserwowane nieprawidłowe wyniki badań nieinwazyjnych. Nie istnieje obecnie badanie laboratoryjne umożliwiające wykrycie wszystkich możliwych zmian w genomie. Nie pozwala na to nawet analiza genomu techniką aCGH (*array Comparative Genomic Hybridization*, porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy) czy całogenomowe NGS (*Next Generation Sequencing*, sekwencjonowanie następnej generacji), które oprócz szerokiego zakresu badania genomu są jednocześnie badaniami drogimi (szczególnie NGS) i wysokospecjalistycznymi oraz wymagającymi dużo więcej czasu na analizę niż badania obecnie stosowane w diagnostyce prenatalnej [5, 13]. W związku z tym, wybór danego typu badania laboratoryjnego zależnie od wskazania i decydowanie się na badania o węższym zakresie, ale o krótszym czasie analizy i mniej kosztowne jest dobrym i spełniającym swą rolę kompromisem.

Wnioski

QF-PCR jest szybką i wiarygodną metodą badania aneuploidii chromosomowych u płodu, która może być stosowana jako jedyna w przypadku ściśle określonych wskazań (wysokie ryzyko wystąpienia aneuploidii u płodu). W innych sytuacjach pacjentce powinno być oferowane badanie kariotypu płodu. Wynik badania QF-PCR powinien zawierać jasną informację o możliwościach diagnostycznych i ograniczeniach tej metody.

Źródło finansowania:

Praca nie była finansowana przez żadną instytucję naukowo-badawczą, stowarzyszenie ani inny podmiot, autorzy nie otrzymali żadnego grantu.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Łacmańska I, Stembalska A. Nowoczesne metody molekularne w prenatalnej diagnostyce inwazyjnej. *Ginekol Pol.* 2013, 84, 871-876.
2. Polski Rejestr Wrodzonych Wad Rozwojowych - <http://www.rejestrwad.pl/>
3. Bocian E. Diagnostyka cytogenetyczna chorób genetycznych. Kryteria i zasady procedury diagnostycznej oraz systemu kontroli jakości badań. *Diag Lab.* 2001, 37, 13-14.
4. Mann K, Hills A, Donaghue C, [et al.]. 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, 32 (12), 1197-204.
5. Scott F, Murphy K, Carey L, [et al.]. Prenatal diagnosis using combined qf-PCR and array CGH analysis as a first line test: results from over 1000 consecutive cases. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013, Feb 8. doi: 10.1002/uog.12429.
6. Mann K, Ogilvie CM. QF-PCR: application, overview and review of the literature. *Prenat Diagn.* 2012, 32 (4), 309-314.
7. Langlois S, Duncan A. Use of a DNA method, QF-PCR, in the prenatal diagnosis of fetal aneuploidies. *J Obstet Gynaecol Can.* 2011, 33 (9), 955-960.
8. Sparkes R, Johnson JA, Langlois S, [et al.]. New molecular techniques for the prenatal detection of chromosomal aneuploidy. *J Obstet Gynaecol Can.* 2008, 30 (7), 617-621, 622-627.
9. Priest JH, Rao KW. Prenatal Chromosome diagnosis. In: The AGT cytogenetics laboratory manual. Eds. Barch MJ, Knudsen T, Spurbeck JL. New York: Lippincott-Raven Publishers. 1997, 199-258.
10. Ustawa o planowaniu rodziny, ochronie płodu ludzkiego i warunkach dopuszczalności przerywania ciąży z dnia 7 stycznia 1993 r. (Dz.U. Nr 17, poz. 78).
11. Grati FR, Malvestiti F, Grimi B, [et al.]. QF-PCR as a substitute for karyotyping of cytotrophoblast for the analysis of chorionic villi: advantages and limitations from a cytogenetic retrospective audit of 44,727 first-trimester prenatal diagnoses. *Prenat Diagn.* 2013, 33 (5), 502-508.
12. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 r. w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych. Dz.U. 2006 nr 61 poz. 435.
13. Tekcan A, Tural S, Elbistan M, [et al.]. The combined QF-PCR and cytogenetic approach in prenatal diagnosis. *Mol Biol Rep.* 2014, 41 (11), 7431-7436.

Oświadczenie autorów

1. Izabela Łacmańska – autor koncepcji i założeń pracy, opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptu – autor odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Justyna Gil – wykonanie badań laboratoryjnych, opracowanie wyników, przygotowanie piśmiennictwa, korekta manuskryptu.
3. Agnieszka Stembalska – zebranie materiału, współautor tekstu pracy, korekta i aktualizacja literatury – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
4. Izabela Makowska – wykonanie badań laboratoryjnych.
5. Joanna Kozłowska – wykonanie badań laboratoryjnych.
6. Paweł Siba – wykonanie badań laboratoryjnych.
7. Halina Czernomazowicz – wykonanie badań laboratoryjnych.
8. Karolina Pesz – zebranie materiału, opracowanie wyników.
9. Ryszard Słężak – zebranie materiału, opracowanie wyników.
10. Robert Śmigiel – zebranie materiału, opracowanie wyników.
11. Aleksandra Jakubiak – zebranie materiału, opracowanie wyników.
12. Anna Doraczyńska-Kowalik – zebranie materiału, opracowanie wyników.
13. Maria M. Sasiadek – ostateczna korekta pracy.