

Nowoczesne metody molekularne w prenatalnej diagnostyce inwazyjnej

New molecular methods in prenatal invasive diagnostics

Izabela Łacmańska*, Agnieszka Stembalska*

* równy udział autorów w przygotowaniu publikacji
Katedra i Zakład Genetyki, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska

Streszczenie

Rozwój technik diagnostycznych umożliwia stosowanie coraz nowszych testów w badaniach prenatalnych. Ich zakres podyktowany jest wskazaniami i obejmować może diagnostykę cytogenetyczną, cytogenetyczno-molekularną i molekularną. Najczęściej diagnozowanymi prenatalnie zmianami genetycznymi są zmiany liczbowe chromosomów (aneuploidie).

W artykule przedstawiono najnowsze metody, wykorzystywane przede wszystkim w prenatalnej diagnostyce liczbowych zmian chromosomowych, ale również metody, które mogą być stosowane do wykrywania zmian strukturalnych chromosomów oraz mutacji genowych. Jednym z głównych atutów tych metod jest krótki czas, jaki upływa do uzyskania miarodajnych wyników. Niektóre z przedstawionych technik są powszechnie stosowane na świecie, jak: QF-PCR (Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction) – oparta na analizie polimorficznych sekwencji, których zestaw jest charakterystyczny dla każdej osoby; MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) – oparta na ligacji sond komplementarnych do badanych fragmentów genomu; CGH do mikromacierzy (Comparative Genomic Hybridization, aCGH) – oparta na hybrydyzacji genomu do mikromacierzy, pozwalająca na analizę całego genomu. Inne z przedstawianych metod są dopiero wprowadzane do inwazyjnej diagnostyki prenatalnej: NGS (Next-generation DNA Sequencing) – sekwencjonowanie nowej generacji, umożliwiające analizę dowolnego fragmentu genomu na poziomie DNA; BoBs (BACs-on-Beads) – technika karyotypowania molekularnego oparta na hybrydyzacji badanego DNA z sondami umieszczonymi na polistyrenowych mikrokulkach.

W Polsce szybka diagnostyka najczęstszych aneuploidii w chwili obecnej nie jest badaniem standardowym, w przeciwieństwie do badania cytogenetycznego (oznaczanie karyotypu). Jednakże, przy określonych wskazaniach szybka diagnostyka może w przyszłości stanowić standardową diagnostykę prenatalną.

Słowa kluczowe: **diagnostyka prenatalna / QF-PCR / BoBs / MLPA /
/ mikromacierze / NGS /**

Adres do korespondencji:

dr n.med. Izabela Łacmańska
Katedra i Zakład Genetyki, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Marcinkowskiego 1, 50-368 Wrocław,
tel.: 71 784 12 56, fax: 71 784 00 63
e-mail izabela.laczmanska@umed.wroc.pl

Otrzymano: 22.04.2013
Zaakceptowano do druku: 30.07.2013

Izabela Łaczmńska, Agnieszka Stembalska. *Nowoczesne metody molekularne w prenatalnej diagnostyce inwazyjne.*

Abstract

New diagnostic techniques employed in laboratories all over the world enable to create new tests for prenatal genetic diagnosis. They include cytogenetics, molecular-cytogenetics and molecular methods. Chromosomal numerical aberrations (aneuploidies) remain to be the most frequent genetic changes diagnosed prenatally.

Therefore, our paper presents the latest methods used mainly in prenatal diagnosis of the most common chromosome numerical changes, as well as other methods applicable in detecting chromosome structural changes or gene mutations. One of the main advantages of these new approaches is the short period of time needed to obtain a result. Some of these techniques are used world-wide: QF-PCR (Fluorescence Quantitative Polymerase Chain Reaction) – based on the analysis of the short polymorphic sequences characteristic for each individual; MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) - based on the probes ligation to complementary genomic fragments in patient DNA; microarray CGH (Comparative Genomic Hybridization) - based on genomic hybridization to microarray, which enables analysis of the entire genome. Other new methods are also gradually introduced to invasive prenatal diagnosis: NGS (Next-generation DNA sequencing) - for the analysis of the whole genome at the DNA level; BoBs (BACS-on-Beads) – molecular-cytogenetic technique based on hybridization of probes immobilized on polystyrene microspheres with fetal DNA.

Nowadays, rapid diagnosis of the most common chromosomal aneuploidies is not a standard procedure in Poland, as opposed to cytogenetics (karyotyping). However, for specific clinical indications, fast and reliable methods of genetic analysis present are likely to become standard procedures in prenatal diagnosis.

Key words: **prenatal diagnostics / QF-PCR / BoBs / MLPA / microarrays / NGS /**

Wstęp

Zgodnie z rekomendacjami Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego (PTG 2009) diagnostyka prenatalna powinna być oferowana każdej kobiecie w ciąży, bez względu na wiek. Diagnostyka przesiewowa w kierunku najczęściej spotykanych wad rozwojowych i aberracji chromosomowych, czyli ultrasonografia między 11 a 13(+6 dni) tygodniem ciąży oraz między 18 a 23 tygodniem ciąży wraz z badaniami biochemicznymi I i II trymestru nie niesie ze sobą żadnego ryzyka dla pacjentki oraz płodu i powinna być traktowana jako standardowa procedura w każdej ciąży [1].

Wskazania do badań prenatalnych inwazyjnych muszą uwzględniać możliwości diagnostyczne, jak i ryzyko związane z wykonywaniem procedur ingerujących w środowisko płodu. Do funkcjonującego w Polsce Programu Badań Prenatalnych, w ramach którego realizowane są także inwazyjne procedury prenatalne, kwalifikowane są kobiety w ciąży:

- 1) w wieku powyżej 35 lat,
- 2) u których w poprzedniej ciąży stwierdzono aberracje chromosomalne u płodu,
- 3) u których stwierdzono występowanie strukturalnych aberracji chromosomowych w rodzinie,
- 4) o znacznie zwiększonym ryzyku urodzenia dziecka dotkniętego chorobą uwarunkowaną monogenicznie lub wieloczynnikowo,
- 5) u których w obecnej ciąży stwierdzono nieprawidłowe stężenie biochemicznych markerów dobrostanu ciąży (ryzyko wyższe lub równe 1/300) lub nieprawidłowy wynik badania USG,
- 6) osoby z rodzin wysokiego ryzyka genetycznego [2].

Należy zaznaczyć, że według rekomendacji PTG z 2009 roku wiek ciężarnej powyżej 35 roku jest słabym czynnikiem warunkującym występowanie aberracji chromosomowych u płodu i wykonywanie badań inwazyjnych w takim przypadku, bez

istnienia innych wskazań, naraża najczęściej niepotrzebnie pacjentkę na ryzyko powikłań. Diagnostyka inwazyjna ze względu na wiek rozważana jest natomiast u kobiet powyżej 40 roku życia [1].

Procedury badań inwazyjnych składają się z kilku etapów: pobrania materiału, izolacji materiału genetycznego, wykonania badań i analizy otrzymanych wyników. Komórki trofoblastu uzyskiwane są podczas biopsji trofoblastu (11-14 tydzień ciąży), komórki płodu podczas amniopunkcji (optymalnie 15-18 tydzień ciąży) lub kordocentezy (powyżej 19 tygodnia ciąży). W zależności od rodzaju badania (cytogenetyczne/molekularne) z dostarczonego do laboratorium materiału izolowane są jądra komórkowe i uzyskiwane metafazy (po hodowli komórkowej – badanie cytogenetyczne) lub DNA (izolacja bezpośrednia) [1].

Zakres badań prenatalnych podyktowany jest wskazaniami i polegać może na diagnostyce:

- 1) cytogenetycznej/cytogenetyczno-molekularnej:
 - a) aberracji liczbowych (w tym najczęstszych aneuploidii jak zespół Downa, Pataua, Edwardsa, Turnera i Klinefeltera) i dużych aberracji strukturalnych,
 - b) zespołów mikrodelecyjnych (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* – FISH) oraz
 - c) zmian w genomie rzędu kilkuset tysięcy par zasad (CGH do mikromacierzy);
- 2) molekularnej:
 - a) chorób monogenowych/wieloczynnikowych, jeśli tylko znane są podstawy genetyczne choroby, istnieją metody diagnostyczne weryfikujące rozpoznanie, a rozpoznanie choroby w okresie życia prenatalnego może mieć znaczenie dla dalszego postępowania w ciąży lub po urodzeniu dziecka (np. mukowiscydoza, zespół kruchego X, achondroplazja, SMA i inne) [3, 4].

Izabela Łączmańska, Agnieszka Stembalska. *Nowoczesne metody molekularne w prenatalnej diagnostyce inwazyjnej.*

Jednym z głównych ograniczeń inwazyjnej diagnostyki prenatalnej, obok możliwości diagnostycznych, jest czas potrzebny do wykonania badania. Powinien być on możliwie jak najkrótszy, ze względu na niepokój pacjentki oraz ewentualne podjęcie decyzji co do leczenia płodu lub zakończenia ciąży w przypadku wyników nieprawidłowych spełniających warunki „Ustawy o planowaniu rodziny, ochronie płodu ludzkiego i warunkach dopuszczalności przerywania ciąży” [1, 5].

W artykule przedstawiono najnowsze stosowane lub wprowadzane do diagnostyki prenatalnej metody molekularne wykorzystywane do badania aneuploidii chromosomowych, jak i analizy innych zmian, w tym zmian na poziomie DNA.

Techniki umożliwiające analizę wybranych regionów. Szybka analiza aneuploidii

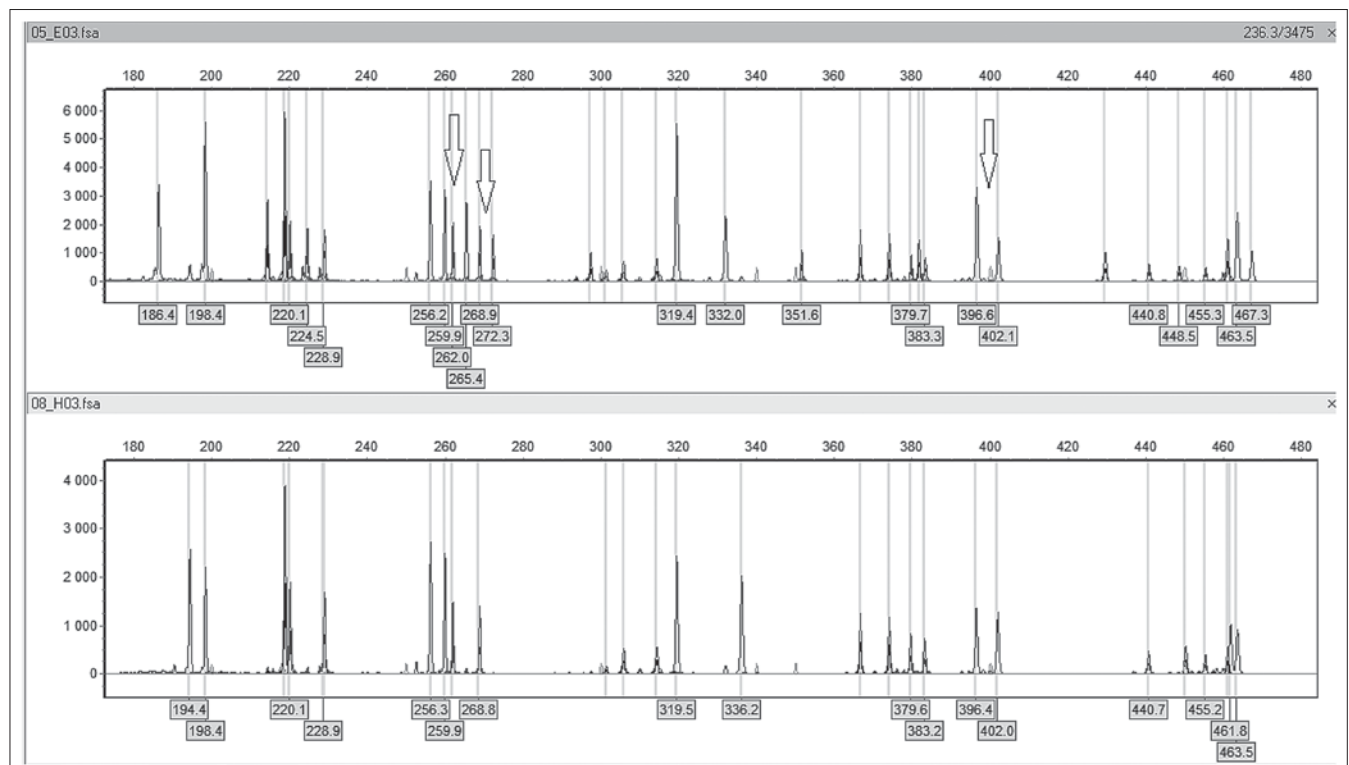
Aneuploidie chromosomowe, które są najczęściej występującymi zmianami genetycznymi u płodu, standardowo diagnozowane są za pomocą analizy prążkowej chromosomów (cytogenetyka klasyczna). Częstość aberracji chromosomowych szacuje się na 60% w poronieniach samoistnych, 6% w przypadku martwych urodzeń oraz 0,6% wśród żywo urodzonych dzieci [6].

Badanie i analiza cytogenetyczna, mimo, że daje jednoznaczną odpowiedź w przypadku aberracji liczbowych i dużych aberracji strukturalnych (zwykle powyżej 10 Mbp zależnie od uzyskanej rozdzielczości badania), trwa około 3 tygodni, co wynika z konieczności założenia hodowli komórek płodu oraz czasu potrzebnego na analizę mikroskopową [7]. Aby skrócić czas oczekiwania na wynik do diagnostyki prenatalnej wprowadzono techniki molekularne umożliwiające badanie najczęstszych aneuploidii chromosomowych w krótkim czasie, nawet do 24

godzin. Badanie takie daje możliwość stwierdzenia lub wykluczenia zespołów Downa, Patau, Edwardsa, a także aberracji liczbowych chromosomów płci (np. zespół Turnera, Klinefeltera) oraz tri- lub tetraploidii. Ograniczenie diagnostyki prenatalnej wyłącznie do analizy określonych chromosomów powinno ściśle wynikać ze wskazań. W Polsce szybka diagnostyka najczęstszych aneuploidii jest traktowana w chwili obecnej jako badanie dodatkowe, wstępne do cytogenetycznej analizy całego kariotypu płodu. Jednakże, przy określonych wskazaniach badanie to mogłoby być standardową diagnostyką prenatalną zamiast badania kariotypu [3].

QF-PCR

Metoda QF-PCR (*Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction*) jest oparta na analizie polimorficznych sekwencji STR (*Short Tandem Repeats* – krótkie powtórzenia tandemowe), których zestaw jest charakterystyczny dla każdej osoby i dziedziczony w połowie od każdego rodzica. Analiza ilościowa oraz jakościowa tych sekwencji pozwala na określenie liczby kopii danego regionu (chromosomu), w obrębie którego zlokalizowana jest dana sekwencja (marker). Metoda ta polega na specyficznym powielaniu sekwencji STR zlokalizowanych na poszczególnych krytycznych badanych chromosomach z użyciem znakowanych fluorescencyjnie starterów. W następnym etapie badania rozdziela się elektroforetycznie otrzymane produkty przy użyciu sekwenatora i analizuje liczbę danych markerów (w prawidłowym DNA występują one w parach, w których mogą różnić się liczbą powtórzeń) oraz wydajność reakcji PCR (dwie kopie danej sekwencji STR będą dawać dwa razy więcej produktu niż jedna kopia) [8]. (Rycina 1).



Rycina 5. Analiza sekwencji STR płodu (górny wykres) oraz pacjentki (dolny wykres). U płodu widoczne trzy kopie każdego z markerów w postaci trzech pików (dwie pierwsze strzałki) lub podwójnej wysokości jednego z pików w stosunku do drugiego piku z pary (trzecia strzałka). U płodu stwierdzono triploidię.

Izabela Łaczmńska, Agnieszka Stembalska. *Nowoczesne metody molekularne w prenatalnej diagnostyce inwazyjne.*

Do wykonania badania konieczne jest pobranie materiału (trofoblast, płyn owodniowy, krew), z którego można wyizolować DNA. QF-PCR umożliwia analizę sekwencji wielu chromosomów w jednej lub kilku reakcjach. Daje to możliwość wykrywania u płodu zmian liczbowych chromosomów. Zakres badania najczęściej dotyczy 5 najczęstszych aneuploidii oraz triploidii, co wynika z dostępności na rynku zestawów diagnostycznych. Możliwa jest także dodatkowo ocena aneuploidii chromosomów: 15, 16 i 22 z jednoczesną oceną 13, 18, 21, X i Y z użyciem zestawu dedykowanego dla materiału z poronień. Możliwa jest także diagnostyka triploidii – w wyniku badania stwierdza się wtedy wszystkie badane markery w trzech kopiach [8, 9, 10].

Metoda QF-PCR umożliwia także ocenę pochodzenia dodatkowego chromosomu u płodu, co uzyskuje się przez porównanie sekwencji STR płodu i rodziców. QF-PCR wykrywa również mozaicyzm (obecność co najmniej dwóch linii komórkowych o różnym kariotypie) na poziomie > 15% oraz pozwala na wykluczenie kontaminacji (zanieczyszczenia) materiałem matczynym, poprzez porównanie profilu płodu oraz profilu ciężarnej uzyskanego z jej krwi [8, 10].

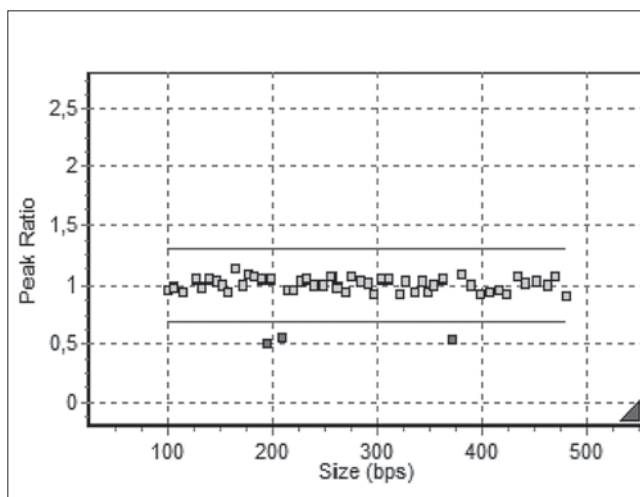
Czułość metody QF-PCR to 95,65% a specyficzność 99,97% dla badanych aneuploidii [3]. Czas diagnostyki przy użyciu QF-PCR można ograniczyć do około 5 godzin. Na rynku dostępne są testy posiadające certyfikat CE-IVD, czyli przeznaczone do diagnostyki *in vitro*. Cena badania mieści się w granicach 600-800 zł (podawane ceny to ceny brutto badań proponowanych przez laboratoria w Polsce).

MLPA

Metoda MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* - amplifikacja sond zależna od ligacji) oparta jest na ligacji sond komplementarnych do badanych fragmentów genomu, np. egzonów genów krytycznych dla danej choroby/zespołu [11]. W MLPA używa się sond połówkowych (czyli jedna sonda podzielona jest na 2 fragmenty) które mogą się połączyć (zligować) tylko na docelowej sekwencji w genomie pacjenta. Liczba sond, które ulegają hybrydyzacji do badanych sekwencji, a następnie ligacji zależy bezpośrednio od liczby sekwencji docelowych w genomie pacjenta, np. pacjent z trisomią 21 ma trzy kopie danej sekwencji dla chromosomu 21, a osoba o prawidłowej liczbie chromosomów – dwie. W przypadku delecji/monosomii u pacjenta występuje jedna kopia badanego regionu. Ilość zligowanych sond mierzona jest poprzez reakcję PCR z wyznakowanym fluorescencyjnie jednym ze starterów i pomiar poziomu fluorescencji w stosunku do próbki prawidłowej. Za normę w reakcji MLPA uważa się wartości +/- 0,3 (od 0,7 do 1,3) w stosunku do próby prawidłowej, czyli wahania fluorescencji uzyskanej dla próbki badanej do prawidłowej do 30% traktowane są jako norma [3, 11, 12]. (Rycina 2).

MLPA umożliwia jednoczesną ocenę kilkudziesięciu sekwencji na raz w jednej reakcji, co jest niewątpliwą zaletą tej metody. Czas jednego oznaczenia zamyka się w 48 godzinach.

W badaniach prenatalnych techniki MLPA można użyć do diagnostyki najczęstszych aneuploidii lub zespołów mikrodelecji. Metoda ta jednak nie posiada certyfikatu CE-IVD i wyniki uzyskane za jej pomocą powinny być potwierdzone inną techniką diagnostyczną. MLPA traktowana jest jako technika przesiewowa, np. prawidłowy wynik badania pozwala lekarzowi na wykluczenie analizowanych mikrodelecji, a wynik pozytywny



Rycina 5. Porównanie fluorescencji sond dla próby badanej i prawidłowej dla zestawu na najczęstsze zespoły mikrodelecyjne (P-245). Sondy zaznaczone poniżej linii hybrydują w obszarze 22q11.2 krytycznym dla zespołu DiGeorge'a. Widoczna delecja 3 markerów (czerwone kwadraciki).

ukierunkowuje dalszą diagnostykę (np. z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych, specyficznych dla danego regionu) [12]. Cena badania MLPA to około 500-800 zł brutto zależnie od stosowanego zestawu.

BoBs

Technika BoBs (*BACs-on-Beads*) to nowa technika kariotypowania molekularnego oparta na hybrydyzacji badanego DNA z sondami umieszczonymi na polistyrenowych mikrokulkach o średnicy 5 mikronów (*on-Beads*). Sondy są namnażane na sztucznych chromosomach bakteryjnych (*BACs - Bacterial Artificial Chromosomes*). W jednym oznaczeniu analizowanych jest po kilka sekwencji dla różnych regionów krytycznych zależnie od proponowanego zestawu. Mikrokulki znakowane są dwoma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi o różnych stężeniach, których kombinacja umożliwia stworzenie i identyfikację około 100 różnych mikrokulek. Badany DNA znakowany jest biotyną. Po związaniu biotynowanego badanego DNA do komplementarnych sond umieszczonych na mikrokulkach do próbki dodawany jest barwnik streptawidyna (związany z fikoerytryną, która ma powinowactwo do biotyny). Jeżeli doszło do hybrydyzacji badanego DNA z sondami, laserowo odczytywany jest poziom fluorescencji dla poszczególnych rodzajów mikrokulek a także identyfikowany jest rodzaj kulek. Porównanie poziomu fluorescencji z wynikiem otrzymanym dla prawidłowego DNA (męskiego oraz żeńskiego) pozwala na detekcję delecji i duplikacji badanych regionów [13]. Zestawy obecnie proponowane przez producenta do diagnostyki prenatalnej obejmują diagnostykę najczęstszych aneuploidii (13, 18, 21, X, Y) oraz najczęstszych mikrodelecji (zespół Wolfa-Hirschhorna, Cri-du-Chat, Williamsa-Beurena, Langer-Giedion, DiGeorge'a (10p14 oraz 22q11.23), Pradera-Williego/Angelmana, Millera-Diekera oraz Smith-Magenis) w jednym zestawie. Metoda ta posiada certyfikat CE-IVD. Czas wykonania badania techniką BoBs wynosi mniej niż 24 godziny a koszt to około 1500 zł [13, 14].

Izabela Łaczmńska, Agnieszka Stembalska. *Nowoczesne metody molekularne w prenatalnej diagnostyce inwazyjne.*

Techniki umożliwiające analizę całego genomu

Analiza całego genomu z wysoką rozdzielczością (dużo większą niż badanie cytogenetyczne) umożliwia diagnostykę zmian ilościowych (delecje/duplikacje) w całym genomie, a także analizę wybranych sekwencji genomu na poziomie DNA. Badanie takie jest szczególnie ważne w przypadkach, w których na podstawie dostępnych danych klinicznych i laboratoryjnych nie jest możliwe postawienie podejrzenia/rozpoznania danego zespołu genetycznego, np. mnogie wady płodu. W diagnostyce postnatalnej analiza całego genomu jest techniką z wyboru u dzieci z niepełnosprawnością intelektualną o nieznannej etiologii i cechami dysmorficznymi [9].

CGH do mikromacierzy

Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (CGH – *Comparative Genomic Hybridization, array CGH - aCGH*) to technika pozwalająca na analizę całego genomu z rozdzielczością nawet do 1 kbp (badanie cytogenetyczne 5-10 Mbp). Zależnie od typu mikromacierzy możliwe jest także wykrycie zmian na poziomie pojedynczych genów a nawet nukleotydów. Mikromacierze najczęściej stosowane na świecie do diagnostyki post- i prenatalnej mają mniejszą rozdzielczość i pozwalają wykryć niezrównoważone zmiany w genomie rzędu kilkuset tysięcy par zasad. Obecnie na rynku dostępne są m.in. mikromacierze dedykowane dla najczęstszych aberracji chromosomowych (tzw. mikromacierze kliniczne), przy pomocy których (w jednym badaniu) można zdiagnozować aneuploidie wszystkich chromosomów, triploidię i niezrównoważone zmiany strukturalne chromosomów, w tym mikrodelecje i mikroduplikacje regionów krytycznych warunkujące występowanie znanych zespołów genetycznych, np. zespołu Pradera-Willego, Wolfa-Hirschhorna, DiGeorge'a. Problemem metody CGH do mikromacierzy może być jednak interpretacja uzyskanego wyniku w przypadku, gdy nie dotyczy on regionów charakterystycznych dla znanych, opisanych jednostek chorobowych. W przypadku stwierdzenia zmiany w genomie, która nie została wcześniej opisana i scharakteryzowana klinicznie, ocena jej wpływu na cechy fenotypowe płodu jest trudna, a w wielu przypadkach niemożliwa [9, 15].

Mikromacierze mogą być jednak szczególnie przydatne w diagnostyce prenatalnej w przypadkach występowania niespecyficznym wad u płodów, u których wykluczono najczęstsze aneuploidie czy znane zmiany strukturalne. Częstość wykrywania przy pomocy CGH do mikromacierzy takich unikalnych zmian u płodów z wadami stwierdzonymi w USG wynosi około 5% [15].

Analiza genomu przy pomocy mikromacierzy zajmuje kilka dni a koszt jednego oznaczenia wynosi około 2000 - 2500 zł.

NGS

NGS (*Next-generation DNA Sequencing* – sekwencjonowanie nowej generacji) jest techniką, która umożliwia analizę dowolnego fragmentu genomu na poziomie DNA. Jak większość technik laboratoryjnych używanych w diagnostyce prenatalnej jest lub raczej zaczyna być wykorzystywana głównie do detekcji aneuploidii, ale teoretycznie można jej użyć do diagnostyki większości znanych zmian genetycznych. Możliwości, jakie niesie ze sobą NGS są bardzo duże, dzięki niemu można przeanalizować nawet cały genom i zdiagnozować zmiany dotyczące pojedyn-

czych nukleotydów, jednakże koszt oznaczenia dla pojedynczej próby jest bardzo wysoki (jedna analiza z użyciem sekwencjonatora NGS kosztuje około 10 000 zł, a pozwala na zsekwencjonowanie około 15 amplikonów o długości 450 pz z najwyższą czułością). Analiza wyników uzyskanych z NGS jest bardzo trudna i wymaga dużych umiejętności oraz specjalistycznej wiedzy bioinformatycznej [16]. Obniżenie kosztów NGS jest możliwe dzięki badaniu wybranych regionów genomu (pojedynczych amplikonów) w wielu próbkach na raz (przy jednym uruchomieniu sekwencjonatora), a także w jednej próbce jako 2-, 4- czy 8-pleksy (istnieje możliwość oznakowania i rozróżnienia poszczególnych pacjentów w jednej próbce) [16, 17].

Technika NGS zaczęła być obecnie stosowana za granicą do diagnostyki zespołu Downa u płodu z krwi matki [16]. Opiera się ona na analizie materiału genetycznego płodu z komórek płodu obecnych w krwi obwodowej matki. Specyficzność oznaczenia przy zastosowaniu duplexu (diagnostyka dwóch próbek w jednej reakcji) pozwala na osiągnięcie 100% czułości i 97,9% specyficzności. Zastosowanie w tym przypadku NGS, jako elementu diagnostyki przesiewowej, pozwala ograniczyć diagnostykę inwazyjną o 98% [16]. Całkowity koszt oznaczenia jest trudny do oszacowania, zależy od liczby amplikonów i liczby pacjentów diagnozowanych przy jednym uruchomieniu sekwencjonatora.

Podsumowanie

Obecnie istnieje wiele metod zarówno cytogenetycznych, jak i molekularnych umożliwiających diagnostykę różnych zespołów genetycznych a także chorób genetycznych uwarunkowanych monogenowo i wieloczynnikowo. W przypadku diagnostyki prenatalnej największy odsetek zmian u płodów stanowią aberracje liczbowe i to one najczęściej są oceniane w inwazyjnej diagnostyce prenatalnej.

Zapotrzebowanie na wykonywanie badań prenatalnych wymusza stosowanie metod umożliwiających skrócenie czasu diagnostyki oraz uzyskanie jak najwięcej informacji podczas jednego oznaczenia, na co pozwalają metody cytogenetyki molekularnej (Rapid-FISH, aCGH, BoBs) oraz metody molekularne (QF-PCR, MLPA, NGS). Należy jednak zaznaczyć, że cytogenetyka klasyczna, mimo że jest metodą o stosunkowo małej rozdzielczości i długim czasie potrzebnym do uzyskania wyniku, jest metodą umożliwiającą diagnostykę zrównoważonych aberracji, np. translokacji czy inwersji, co czyni ją w tym zakresie niezastąpioną.

Metody, takie jak aCGH i NGS, umożliwiają bardzo dokładne zbadanie całego genomu, co niesie ze sobą praktycznie nieograniczone możliwości diagnostyczne, zależne tylko od stanu wiedzy i możliwości interpretacji otrzymanych wyników. Ograniczeniem, jeśli chodzi o powszechne stosowanie tych metod, są jednak: niewysoka częstość wykrywania zmian, wysokie koszty analizy oraz niedostateczna wiedza na temat niektórych wykrywanych zmian. Technika NGS można zdiagnozować każdą znaną zmianę na poziomie DNA, aczkolwiek koszty takiego oznaczenia dla pojedynczego przypadku są bardzo duże.

Niewątpliwą zaletą technik molekularnych stosowanych w analizie zmian genomu, w przeciwieństwie od analizy zestawu chromosomów w klasycznej cytogenetyce, jest możliwość badania wielu dowolnych regionów genomu, modyfikowanie istniejących lub tworzenie nowych zestawów, zależnie od potrzeb diagnostycznych.

Izabela Łączmańska, Agnieszka Stembalska. *Nowoczesne metody molekularne w prenatalnej diagnostyce inwazyjne.*

Oświadczenie autorów:

1. Dr n. med. Izabela Łączmańska – 50% – równy udział autorów w przygotowaniu publikacji – autor zgłaszający – odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Dr n. med. Agnieszka Stembalska – 50% – równy udział autorów w przygotowaniu publikacji.

Piśmiennictwo

1. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące postępowania w zakresie diagnostyki prenatalnej. *Ginekol Pol.* 2009, 80, 390-393.
2. <http://www.nfz-warszawa.pl/index/programy5>
3. Sparkes R, Johnson J, Langlois S, [et al.]. New molecular techniques for the prenatal detection of chromosomal aneuploidy. *J Obstet Gynaecol Can.* 2008, 30, 617-621.
4. Raymond F, Whittaker J, Jenkins L, [et al.]. Molecular prenatal diagnosis: the impact of modern technologies. *Prenat Diagn.* 2010, 30, 674-681.
5. Ustawa o planowaniu rodziny, ochronie płodu ludzkiego i warunkach dopuszczalności przerywania ciąży z dnia 7 stycznia 1993 r. (Dz.U. Nr 17, poz. 78).
6. Polski Rejestr Wrodzonych Wad Rozwojowych - <http://www.rejestrwad.pl/>
7. Bocian E. Prenatalna diagnostyka cytogenetyczna chorób genetycznych. Klasyczne metody i zasady oceny kariotypu. *Med Sci Rev Genet.* 2004, 27-33.
8. Langlois S, Duncan A. Use of a DNA method, QF-PCR, in the prenatal diagnosis of fetal aneuploidies. *J Obstet Gynaecol Can.* 2011, 33, 955-960.
9. 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, 41, 500-507.
10. 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 1197-1204.
11. <http://www.mrc-holland.com/WebForms/WebFormMain.aspx>
12. Łączmańska I, Łączmański Ł. Metoda MLPA oraz jej zastosowanie w diagnostyce chorób uwarunkowanych genetycznie. *Postępy Biologii Komórki.* 2009, 36, 555-563.
13. Vialard F, Simoni G, Aboura A, [et al.]. Prenatal BACs-on-Beads™ : a new technology for rapid detection of aneuploidies and microdeletions in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2011, 31, 500-508.
14. Piotrowski K, Henkelman M, Zajaczek S. Will the new molecular karyotyping BACs-on-Beads technique replace the traditional cytogenetic prenatal diagnostics? Preliminary reports. *Ginekol Pol.* 2012, 83, 284-290.
15. Chan L, Choy K, Leung T, Lau T. Prenatal diagnosis by array-comparative genomic hybridization. *Expert Opin Med Diagn.* 2009, 3, 649-657.
16. Hahn S, Lapaire O, Tercanli S, [et al.]. Determination of fetal chromosome aberrations from fetal DNA in maternal blood: has the challenge finally been met? *Expert Rev Mol Med.* 2011, 4, 13:e16. doi: 10.1017/S1462399411001852.
17. Bell C, Dinwiddie D, Miller N, [et al.]. Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. *Sci Transl Med.* 2011, 3(65), 65ra4. doi: 10.1126/scitranslmed.3001756.