

Czy nowa technika kariotypowania molekularnego *BACs-on-Beads*TM zastąpi klasyczną cytogenetyczną diagnostykę prenatalną? Wyniki wstępne

Will the new molecular karyotyping *BACs-on-Beads*TM technique replace the traditional cytogenetic prenatal diagnostics? Preliminary reports

Piotrowski Krzysztof, Henkelman Małgorzata, Zajączek Stanisław

Samodzielna Pracownia Cytogenetyki Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, Polska

Streszczenie

Wstęp: W ostatnich latach podjęto próby wprowadzenia do diagnostyki prenatalnej technik cytogenetyki molekularnej. Mogą one być stosowane do diagnostyki aneuploidii, jednak przede wszystkim, powinny być wykorzystane do diagnozowania mikroaberracji, które nie ujawniają się w rutynowym kariotypowaniu amniocytów z powodu jego niskiej rozdzielczości.

Cel pracy: Celem pracy była wstępna ocena nowej metody *BACs-on-Beads* (BoBs) przeznaczonej do szybkiego wykrywania wybranych delecji i duplikacji w obrębie badanego DNA w inwazyjnej diagnostyce prenatalnej.

Materiał i metoda: Przeprowadzono diagnostykę prenatalną przy jednoczesnym użyciu techniki BoBs i techniki klasycznej w 54 ciążach.

Wyniki: Metoda wykazała pełną zgodność z rutynowymi technikami w 98,2%.

Wykazano, że główną zaletą techniki BoBs jest możliwość bardzo szybkiego wykonania badania, przy znacznie rozszerzonym profilu diagnostycznym.

Wnioski: W odróżnieniu od innych proponowanych prenatalnie technik kariotypowania molekularnego, metoda BoBs charakteryzuje się niższym kosztem i poziomem komplikacji stosowanej aparatury.

Przypuszczamy, że metoda ta zastąpi klasyczne metody cytogenetyczne w rutynowej diagnostyce prenatalnej.

Słowa kluczowe: **diagnostyka prenatalna / kariotypowanie molekularne / mikroaberracje chromosomów /**

Adres do korespondencji:

Pracownia Cytogenetyki i Diagnostyki Prenatalnej PUM
Polska, 70-115 Szczecin, ul. Połabska 4
tel./fax. +48 91 4661565
e-mail: pregiag@hotmail.com

Otrzymano: 21.11.2011
Zaakceptowano do druku: 20.03.2012

Summary

Recently several attempts have been made to introduce molecular karyotyping techniques into prenatal diagnosis. These methods can be used not only for the diagnosis of classical aneuploidies, but first of all they should be employed in the diagnostics of microaberrations, which are not revealed by low resolution methods of classical cytogenetics.

The new method BACs-on-Beads is designed for quick detection of broad panel of aneuploidies and microdeletions, by the specified detection of deletions and duplications in the examined fetal DNA acquired from amniocytes. Prenatal diagnostics was performed with the use of BACs-on-Beads and classical amniocyte karyotyping simultaneously in a group of 54 pregnancies. This new method proved to be fully compatible with typical karyotyping in cultures of amniocytes in 98,2%.

It was confirmed that the main advantage of this method is the possibility of quick diagnosis, within 48 hours, with much wider spectrum of detected anomalies when compared to classical methods. Contrary to other molecular karyotyping methods, the BACs-on-Beads technique is more economical, less time consuming and less complex equipment is needed than in case of other methods. We suppose that this technique can replace classical karyotyping methods in the near future.

Key words: **molecular karyotyping / prenatal diagnosis / microaberrations /**

Wstęp

Od lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku, standardem w diagnostyce prenatalnej jest klasyczna ocena kariotypu z hodowli komórkowych (trofoblastu, amniocytów) pozwalająca wykryć aneuploidie oraz duże rearanżacje strukturalne chromosomów.

W ostatnich latach podjęto próby wprowadzenia do diagnostyki prenatalnej technik cytogenetyki molekularnej (TCM), takich jak FISH (*Fluorescence in situ Hybridisation*), RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaction*), MLPA *Multiplex Ligation Dependent Probe Application*) lub – najdokładniejszy *array CGH (Comparative Genom Hybridisation)* [1, 2, 3, 4, 5].

Mogą one być stosowane do diagnostyki aneuploidii, jednak powinny być wykorzystane zwłaszcza do diagnozowania mikroaberracji, które nie ujawniają się zazwyczaj w rutynowym kariotypowaniu amniocytów, z powodu niskiej rozdzielczości. Metody TCM pozwalają znacznie skrócić czas uzyskania wyniku (np. *rapid FISH* w interfazie), jednak wymagają wyspecjalizowanego laboratorium z unikalnym sprzętem. Jednocześnie jako badania celowane, pozwalają potwierdzić/wykluczyć wstępnie podejrzaną patologię. W sytuacji konieczności kolejnego weryfikowania kilku możliwych aberracji, są wysoce kosztowne.

W niektórych krajach badania typu *rapid FISH* są standardem w rutynowej diagnostyce prenatalnej, pozwalającym w czasie 48 godzin uzyskać jednocześnie ocenę aneuploidii chromosomów 13, 18, 21, X/Y, które stanowią jednak jedynie około 70% wszystkich niezrównoważeń u płodów [6, 7].

Istnieje dobrze opracowany i powszechnie stosowany algorytm wczesnego wykrywania aneuploidii w oparciu o przesiewowe badania USG i biochemiczne w I trymestrze ciąży [8]. Brak jednak schematu diagnostycznego dla mikrodelecji (MD), pomimo dobrze poznanych zmian postnatalnych i ich wykrycie prenatalne zazwyczaj bywa przypadkowe [9]. Wiele zespołów mikrodelecyjnych, jak np. Zespół Wolfa-Hirschhorna (WHS) może ujawnić się w formie zmian niespecyficznych i dopiero w III

trymestrze: IUGR, małowodzie, rzadka wada stożka tętniczego serca lub zmiany w mózgu. Podejrzewany zespół mikroaberracji można potwierdzić jedynie badaniem ukierunkowanym prenatalnie lub, najczęściej – postnatalnie. Kariotyp z typową niską rozdzielczością, uzyskaną w badaniu amniocytów zazwyczaj jest „prawidłowy”, a dodatkowe badanie FISH, przy objawach niespecyficznych, nie zawsze właściwie dobrane.

Najdokładniejszym badaniem TCM, możliwym do zastosowania w diagnostyce prenatalnej jest mikroarray-CGH, jednakże w praktyce metoda ta wdrażana jest bardzo rzadko z uwagi na ograniczoną dostępność aparatury, bardzo wysokie koszty i konieczność udziału wysoce specjalistycznego personelu [10, 11]. Wskazaniami do zastosowania tej metody mogą być niecharakterystyczne malformacje u płodu, nieswoiste i nie dające się przyporządkować typowym aberracjom, gdy kariotyp płodu jest prawidłowy. Zaproponowano wskazania dla poszukiwania mikroaberracji z wykorzystaniem aCGH w postępowaniu diagnostycznym postnatalnym, w którym objawem osiowym jest opóźnienie umysłowe i jedynie minimalne cechy dysmorfii; kryteriów takich nie da się obecnie zastosować u płodu.

Ponadto, precyzyjne badanie a-CGH może ujawnić rearanżacje genomu o nieznanym, być może wcale nie-chorobowym znaczeniu. Częsty brak możliwości jednoznacznego przełożenia zmiany w DNA u płodu na skutki kliniczne u przyszłego dziecka (korelacja genotyp – fenotyp), nie pozwoliło uzyskać dla aCGH statusu badania rekomendowanego w rutynowej diagnostyce prenatalnej zarówno w Europie jak i w Ameryce [12, 13].

Problemy te w znacznym stopniu rozwiązuje wprowadzona przez firmę Perkin-Elmer w 2010 roku nowa technika kariotypowania molekularnego *BACs-on-BEADSTM* (BoBs), która charakteryzuje się znacznie większą możliwością szybkiej jednoczesnej oceny występowania najczęściej poszukiwanych aneuploidii, 9 klasycznych mikrodelecji, a ostatnio także aberracji subtelomerowych (ST) i okołocentromerowych wszystkich 46 chromosomów [14, 15].

Czy nowa technika kariotypowania molekularnego *BACs-on-Beads™* zastąpi klasyczną cytogenetyczną diagnostykę prenatalną?

Charakterystyka metody *BACs-on-BEADS™*

BoBs przeznaczony jest do szybkiego wykrywania określonych delecji i duplikacji w obrębie badanego DNA. Technologia ta wykorzystuje sondy DNA uzyskane ze sztucznych chromosomów bakteryjnych (*Bacterial Artificial Chromosomes – BACs*), które są opłaszczane na polistyrenowych mikrokulkach (*-on-Beads*). Odpowiednie zestawy są przygotowane w formie paneli. Następnie wzorcowy i badany DNA poddany jest hybrydyzacji z sondami na powierzchni kulek. Hybrydyzacja badanego DNA płodowego (lub jej brak) jest wykrywana w mikrokapilarze aparatu, w którym ocenia się za pomocą lasera dwa różne znakujące barwniki. Intensywność ich świecenia zależna jest od wystąpienia i poziomu hybrydyzacji.

Jednorazowo stosowanych jest po pięć markerów przeznaczonych do wykrywania każdej z aneuploidii chromosomów 13, 18, 21, X i Y (miejsca krytyczne) oraz od 4 do 8 niezależnych markerów dla 9 mikrodelecji, co daje łączną liczbę 80 analizowanych regionów DNA. (Tabela I).

Tabela I. Zakres diagnostyczny metody *BACs-on-BEADS™*.

Lokalizacja chromosomowa	Oceniany zespół	Liczba klonów w panelu
13	Patau	5
18	Edwards	5
21	Down	5
X	Turner etc.	5
Y	Klinefelter's etc.	5
22q11.2	DiGeorge I	4*
10p14	DiGeorge II	4*
7q11.23	Williams-Beuren	5*
15q11.2	Prader-Willi Angelman	7*
17p11.2	Smith-Magenis	4*
4p16.3	Wolf-Hirschhorn	5*
5p15	Cri du Chat	8*
8q24	Langer-Giedion	7*
17p13.3	Miller-Dieker	6*

Dodatkowo:

46 aberracji subtelomerowych ramion p i q*,

46 aberracji okołowcentromerowych ramion p i q*

*- Zespoły dotychczas nie identyfikowane w rutynowej diagnostyce prenatalnej.

Kryteriami, które zdecydowały o włączeniu danej mikrodelecji do panelu badań były:

1. Relatywnie częste występowanie u noworodków (każda średnio 1:4000).
2. Znaczna śmiertelność.
3. Łagodne, niespecyficzne markery USG.
4. Jasno wyrażona korelacja genotyp-fenotyp oraz znana historia naturalna choroby.

Spośród włączonych do panelu mikrodelecji jedynie detekcja zespołu Pradera-Willego (PWS) wynosi 70% wszystkich przypadków, co wynika z możliwych różnych mechanizmów (także mutacje punktowe, defekty metylacji) powodujących ten zespół.

Łącznie szacowana częstość występowania wszystkich badanych metodą BoBs zmian (bez aberracji subtelomerowych i okołowcentromerowych) u płodów wynosi 1:1700 niezależnie od wieku ciężarnej [14].

Najtrudniejszym etapem badania jest izolacja DNA z niewielkiej dostępnej ilości amniocytów. Wystarczające dla uzyskania wyniku jest posiadanie 50ng genomowego DNA płodu. Uzyskanie wystarczającej próbki DNA jest możliwe tylko pod warunkiem odpowiedniej ilości dostarczonego materiału płodowego, zbyt mała objętość próbki może uniemożliwić uzyskanie wyniku.

Metoda BoBs pozwala na określenie obecności wymienionych aberracji chromosomowych w czasie 48 godzin od pobrania wód płodowych, fragmentu kosmka lub krwi pępowinowej.

Celem sprawdzenia wartości tej metody postanowiliśmy przeprowadzić diagnostykę prenatalną przy jednoczesnym użyciu techniki BoBs i rutynowej hodowli komórek płodu.

Materiał i metoda

Materiał badany stanowiły komórki z płynu owodniowego, CVS i kordocentezy. Z części materiału izolowano DNA płodowe, jednocześnie amniocyty, trofoblast i limfocyty poddawano klasycznej hodowli komórkowej do oceny genetycznej.

W każdej badanej próbce wykonywano rutynowo wykrywanie możliwej obecności krwi matczynej testem APT [16].

Badania przeprowadzono u 54 pacjentek w okresie 01.01.2011–30.09.2011, zakwalifikowanych na podstawie typowych wskazań do procedury prenatalnej diagnostyki inwazyjnej. Były to:

- podwyższone ryzyko (<1:250) w teście przesiewowym I trymestru niezależnie od wieku,
- obecność niecharakterystycznych ultrasonograficznych markerów niezależnie od wyniku testu przesiewowego.

Łącznie ze wskazań testu przesiewowego przeprowadzono 31 badań, ze wskazań jedynie ultrasonograficznych przeprowadzono 23 badania.

DNA izolowano metodą kolumnkową za pomocą zestawu odczynników QIAamp Mini Kit (QIAGEN). Badaną próbkę, jak i próbkę referencyjną znakowano przez enzymatyczne włączenie biotynylowanych nukleotydów, a następnie oczyszczano przy użyciu zestawu Pure Link PCR Purification Kit (Invitrogen).

Wyznakowane i oczyszczone DNA hybrydyzowano przez 20 godzin z mieszaniną mikrokulek BoBs. Po zakończeniu hybrydyzacji, tak przygotowaną mieszaninę odpłukiwano, a następnie inkubowano z reporterowym koniugatem streptawidyny-fitoerytryny, wiążącym się z biotynylowanym DNA. Po ponownym oczyszczeniu materiału przeprowadzono pomiar intensywności sygnału świadczącego o wystąpieniu lub braku hybrydyzacji w kapilarze aparatu Luminex (Luminex Corporation) za pomocą 2 niezależnych laserów dla światła zielonego i czerwonego, o długościach fali odpowiednio 635nm i 532nm.

Wynik w postaci graficznej uzyskiwano przy użyciu oprogramowania BoBsoft analysis software. (Rycina 1).

Piotrowski K, et al.

Uzyskane wyniki przyrównywano do wyników otrzymanych u tych samych pacjentek technikami klasycznymi – każda pacjentka uzyskała łączny wynik z konsultacją genetyczną.

Dodatkowo, celem sprawdzenia precyzji wykrywania linii mozaikowych wykonano w podobny sposób badanie przygotowanych wcześniej DNA „sztucznych mozaik”, które uzyskiwano przez odpowiednie ilościowo zmieszanie znormalizowanego DNA prawidłowego z DNA płodu o potwierdzonej aneuploidii, tak aby stężenie dodanego DNA w ostatecznej mieszaninie wynosiło: 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5% i 0%.

Wyniki

Badanie wykonano w 54 ciążyach. Średnia wieku pacjentek wynosiła 31,7 lat, powyżej 35 roku życia (podwyższone ryzyko *a priori*) – 18 pacjentek. Średni wiek ciążowy wynosił 17,3 Hbd (12,0-25,0).

Łącznie z 54 próbek badanych, 4 nie nadawały się do analizy BoBs z powodu złej jakości DNA; w 1 przypadku była to mała ilość materiału do izolacji DNA i w 3 przypadkach mocno skrwawiony płyn owodniowy, zatem wystąpiło 7,4% niepowodzeń procedury wynikających bezpośrednio z nieprawidłowego

pobierania materiału, natomiast pacjentki te uzyskały wynik z technik klasycznych.

Badanym materiałem było DNA amniocytów z wód płodowych – 46 (85,2%), trofoblastu z CVS – 3 (5,6%), limfocytów z kordocentezy – 5 (9,3%).

Nieprawidłowości kariotypu stwierdzono w 29 ciążyach (52%). Stwierdzone nieprawidłowości to: trisomie 13 – 3 (7,7%), trisomie 18 – 6 (23,1%), trisomie 21 – 14 (53,9%), monosomie X – 4 (11,5%), mikrodelecje (WHS) – 1 (3,8%) oraz triploidia 69,XXY – 1 (3,8%).

We wszystkich przypadkach wykazujących nieprawidłowości wystąpiła zgodność wyników uzyskanych techniką BoBs z hodowlą komórkową z wyjątkiem pojedynczego przypadku triploidii, której badanie molekularne nie wykryło (1,9%).

Średni czas uzyskania wyniku techniką BoBs wynosił 48 godzin, podczas gdy średni czas technik klasycznych – 17 dni.

Weryfikacja badania mozaik wykazała, że próg detekcji dla trisomii 13 i 18 wynosił 50% domieszki DNA trisomicznego, dla monosomii X wynosił 25% domieszki, dla trisomii 21 – 25%, a w 2 przypadkach nawet 12,5%.

18C1, 67 18p11	1,08	1,09	2.735-2.908	
18C2, 68 18p11	1,10	1,13	13.989-14.143	
18C3, 69 18q12	0,98	1,00	30.827-30.986	
18C4, 70 18q21	1,05	1,00	51.861-52.034	
18C5, 73 18q22	0,90	0,84	61.790-61.971	
21C1, 74 21q22	1,30	1,25	32.208-32.373	
21C2, 75 21q22	1,20	1,25	34.661-34.820	
21C3, 76 21q22	1,35	1,31	35.229-35.372	
21C4, 77 21q22	1,30	1,31	43.556-43.770	
21C5, 78 21q22	1,37	1,36	44.146-44.311	
AUTO1, 55 2p12	0,98	0,95	78.305-78.456	
AUTO2, 56 4p12	1,00	1,07	48.049-48.241	
AUTO3, 57 6q14	0,98	1,00	78.576-78.751	
AUTO4, 58 10p11	1,05	0,98	33.373-33.522	
AUTO5, 59 12p13	1,00	1,02	11.529-11.740	
AUTO6, 61 14q11	1,05	1,04	19.571-19.731	

a)

WBS1, 43 7q11	1,12	1,07	72.598-72.717	
WBS2, 44 7q11	1,07	0,97	72.640-72.819	
WBS3, 45 7q11	1,02	0,91	73.048-73.146	
WBS4, 46 7q11	1,06	0,97	73.146-73.291	
WBS5, 47 7q11	1,06	0,95	73.500-73.639	
WHS1, 48 4p16	0,73	0,73	1.467-1.677	
WHS2, 49 4p16	0,79	0,73	1.595-1.785	
WHS3, 53 4p16	0,79	0,69	1.705-1.918	
WHS4, 99 4p16	0,79	0,78	1.850-2.043	
WHS5, 54 4p16	0,74	0,69	2.127-2.322	
XC1, 79 Xp22	1,02	1,45	6.958-7.137	
XC2, 80 Xp22	0,96	1,47	10.699-10.763	
XC3, 81 Xp21	0,99	1,39	37.368-37.555	
XC4, 84 Xq13	1,08	1,50	73.303-73.450	
XC5, 85 Xq27	1,00	1,53	146.757-146.960	

b)

Rycina 1. Przykłady ostatecznych wyników uzyskanych metodą BACs-on-BEADS™. a – Trisomia 21, b – Zespół Wolfa-Hirshchorna.

Czy nowa technika kariotypowania molekularnego *BACs-on-Beads™* zastąpi klasyczną cytogenetyczną diagnostykę prenatalną?

Tabela II. Wartości progowe detekcji badanych mozaik metodą *BACs-on-BEADS™*. xD – wykryta, ND – niewykryta

N	trisomia	12,5%	25%	50%	75%	100%
4	T 13	ND	ND	D	D	D
3	T 18	ND	ND	D	D	D
5	T 21	ND/D	D	D	D	D
4	X0	ND	D	D	D	D

Dyskusja

Nasze obserwacje wykazały, że główną zaletą techniki BoBs jest możliwość bardzo szybkiego wykonania badania, przy znacznie rozszerzonym profilu diagnostycznym w stosunku do techniki klasycznej.

Jednocześnie metoda wykazała pełną zgodność z metodami klasycznymi w 98,2%. Wyjątkiem był przypadek poliploidii, która nie może być wykryta tą techniką, jednak w realnej diagnostyce poliploidia byłaby i tak odpowiednio wcześniej zidentyfikowana ze względu na duże markery ultrasonograficzne. Brak możliwości wykrycia poliploidii potwierdził także Vialard i wsp. w jedynej jak dotychczas publikacji dotyczącej weryfikacji techniki BoBs [14]. Był to zatem jedyny wynik fałszywie ujemny, natomiast nie stwierdzono żadnego wyniku fałszywie dodatniego.

Najtrudniejszym etapem badania jest izolacja DNA z niewielkiej dostępnej ilości amniocytów. Zgodnie z metodyką, wystarczającą ilością jest uzyskanie 50 ng genomowego DNA płodu. Nasze obserwacje wykazały, że wiarygodne rezultaty można uzyskać posługując się znacznie mniejszymi ilościami DNA, aniżeli zalecane. (Tabela II).

Koszty badania dla pojedynczej próbki kształtują się obecnie na poziomie około 1500 PLN i są porównywalne z kosztem klasycznego badania. Natomiast w odróżnieniu od innych proponowanych prenatalnie technik molekularnych, metoda BoBs charakteryzuje się niższym kosztem i mniejszym poziomem komplikacji stosowanej aparatury, a zatem łatwiejszą obsługą. Technika powstała z myślą o przesiewowej diagnostyce prenatalnej, jednakże może być z powodzeniem wykorzystana w tej samej pracowni i poradni równolegle do innych celów, np. w diagnostyce poronień i postnatalnej diagnostyce zaburzeń chromosomowych, co również wykorzystujemy z powodzeniem w naszej pracowni. Daje to nam znaczne oszczędności czasu i finansowania.

Mozaiki, zwłaszcza w trisomii 21 i monosomi X stanowią trudny problem diagnostyczny, także w klasycznej cytogenetyce prenatalnej, jednakże występują tylko w niewielkim odsetku amniopunkcji. Największa przeprowadzona metaanaliza pochodząca z 60 ośrodków amerykańskich i obejmująca 60 tys. amniocentez wykazała ich średnie pojawianie się w 0,25% ciąży. E. Bocian w ekspertyzie dla Ministerstwa Zdrowia z 2001 r., zaprezentowała współczesne poglądy na temat granicznych wartości odsetka linii mozaikowych, które powinny być wykryte w prawidłowym badaniu cytogenetycznym płodu, oceniając je na poziomie od 10 do 25% takich komórek [15, 17]. Wyniki naszych obserwacji w tym zakresie przedstawiono w tabeli II. Metoda pozwoliła ujawnić mozaiki w różnych odsetkach dla różnych aneuploidii.

Dla trisomii 21 wykrywalność pewną uzyskano dla odsetka 25% nieprawidłowego DNA, a w pojedynczych przypadkach dla 12,5%, co jest wynikiem zadowalającym, lepszym od uzyskanych przez Vialarda F. i wsp., który wykrywa linie trisomiczne 21 przy odsetku przynajmniej 25% [14, 18].

Wykrywanie mozaikowej trisomii 13 i 18 jest, jak dotąd, możliwe przy odsetku 50%, jednak zespoły te mają również w mozaikach wysoce czułe markery ultrasonograficzne i diagnosta prenatalny powinien podejrzewać chorobę u płodu we wczesnych etapach ciąży; jednak dopuszczalna jest możliwość niewykrycia bardzo niskoodsetkowej linii mozaikowej. Próg czułości rozpoznania mozaiki w klasycznej diagnostyce cytogenetycznej określony jest jako odsetek nieprawidłowych komórek, podczas gdy w metodach molekularnych oceniany jest jako odsetek izolowanego DNA. Trudno zatem porównywać te dwie metody, jednak wydaje się, że czułość wykrywania jest zbliżona w obydwu metodach.

Zespoły mikrodelecyjne, nazywane zespołami przyległych genów, należą do grupy chorób genomowych i pojawiają się w rozwoju człowieka 1000 razy częściej, aniżeli mutacje punktowe. Fenotyp mikrodelecyjny u dzieci obejmuje niepełnosprawność intelektualną, obecność ponad jednej malformacji, pre- i postnatalne opóźnienie rozwoju somatycznego, często spektrum cech autystycznych. Prenatalnie zatem trudno jest podejrzewać mikrodelecję, a jeszcze trudniej ukierunkować badanie na konkretny zespół [19].

Aberracje subtelomerowe (ST) są bardzo różnorodne i bardzo niebezpieczne klinicznie, ponieważ w rejonach subtelomerowych występuje największe zagęszczenie sekwencji kodujących. Często aberracje te są letalne. ST poszczególnych chromosomów wykazują znaczne zróżnicowanie ekspresji fenotypowej, manifestujące się odrębnymi patologiami, ale z reguły towarzyszy im znaczny stopień niepełnosprawności intelektualnej. Zmiany te nadal są mało poznane, a ich rzeczywista częstość występowania prenatalnego nie jest znana.

Dotychczas nie udało się wytypować markerów ultrasonograficznych płodu dla ST poza możliwym IUGR. Opracowano natomiast postnatalne kryteria (kryteria de Vriesa) obejmujące niepełnosprawność intelektualną, małągłowię, minimum 2 cechy dysmorfii – zazwyczaj hiperteloryzm i malformacje uszu. Spośród nich jedynie hiperteloryzm mógłby być kandydatem na prenatalny marker genetyczny. IUGR nie zawsze ujawnia się do II trymestru, zatem jego wartość jako markera dla ST pozostaje niewielka.

Tabela III. Wyniki badania porównawczego uzyskane metodą *BACs-on-BEADs™*, oraz metodą klasyczną.

Wskazania do diagnostyki inwazyjnej	Pochodzenie próbki	Wiek ciążowy w terminie badania	Stężenie DNA (ng/μl)	Analiza BoBs	Badanie potwierdzające	
					Wynik hodowli lub FISH	Metoda
Nieprawidłowy wynik testu	AF	15,3	7,5	47,XX,+21	47,XX,+21	Karyotyp
Nieprawidłowy obraz USG	AF	20,2	13,5	47,XY,+18	47,XY,+18	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu Nieprawidłowy obraz USG	AF	14/15	27	45,X	45,X	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu	AF	18,2	8	47,XY,+21	47,XY,+21	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu	AF	17,1	18,5	47,XX,+21	47,XX,+21	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu	AF	16,1	20,5	47,XX,+21	47,XX,+21	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu	AF	16	34	47,XX,+21	47,XX,+21	Karyotyp
Wiek ciążowej >40lat	AF	16,2	28,5	47,XX,+21	47,XX,+21	Karyotyp
Nieprawidłowy obraz USG	Krew	22	36	47,XX,+18	47,XX,+18	Karyotyp
Nieprawidłowy obraz USG	AF	16,6	91,5	47,XX,+13	47,XX,+13	Karyotyp
Nieprawidłowy obraz USG	AF	18,2	23	Nieudana	69,XXY	Karyotyp
Nieprawidłowy obraz USG	AF	17	13	47,XY,+21	47,XY,+21	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu Nieprawidłowy obraz USG	CVS	14	200,5	45,X	45,X	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu Nieprawidłowy obraz USG	AF	15,5	44	47,XY,+21	47,XY,+21	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu	AF	15,3	9,5	Nieudana	47,XX,+18	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu Wiek ciążowej >40lat	CVS	14,4	17,5	47,XY,+18	47,XY,+18	Karyotyp
Nieprawidłowy obraz USG	Krew	25	119	47,XX,+13	47,XX,+13	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu Nieprawidłowy obraz USG	AF	16,1	14	Nieudana	47,XY,+21	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu	AF	16,1	10	Nieudana	47,XX,+21	Karyotyp
Nieprawidłowy obraz USG	AF	17,1	30	47,XX,+13	47,XX,+13	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu	AF	15,5	33,5	47,XX,+18	47,XX,+18	Karyotyp
Nieprawidłowy obraz USG	CSV	12	72	47,XX,+18	47,XX,+18	Karyotyp
Nieprawidłowy obraz USG	AF	14,1	32	45,X	45,X	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu	AF	15,5	36	47,XX,+21	47,XX,+21	Karyotyp
Nieprawidłowy obraz USG	AF	15,1	14,5	47,XY,+21	47,XY,+21	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu	AF	15,3	15,5	47,XY,+21	47,XY,+21	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu Wiek ciążowej >40lat	AF	16,2	30,5	47,XY,+21	47,XY,+21	Karyotyp
Nieprawidłowy wynik testu Nieprawidłowy obraz USG	AF	13,3	7	47,XX,+18	47,XX,+18	Karyotyp
Nieprawidłowy obraz USG	Krew	25	220,5	WHS	WHS	FISH
10 prawidłowych kariotypów żeńskich				46,XX	46,XX	Karyotyp
15 prawidłowych kariotypów męskich				46,XY	46,XY	Karyotyp

Czy nowa technika kariotypowania molekularnego BACs-on-Beads™ zastąpi klasyczną cytogenetyczną diagnostykę prenatalną?

Dotychczas opublikowano nieliczne badania USG u płodów z mikrodelecjami i aberracjami ST potwierdzonymi różnymi metodami, jednak innymi aniżeli BoBs. Największym badaniem tego typu jest praca Le Caigneca i wsp. [20], który opisał malformacje u 49 takich płodów, po kilka płodów lub pojedyncze płody opisali także Fass i wsp., Piotrowski i wsp. [10, 11].

Podsumowując zebrane informacje w chwili obecnej można przyjąć, iż przy prawidłowym kariotypie standardowym płodu, poza IUGR, podejrzenie MD lub ST należy rozważyć przy współwystępowaniu: wad stożka tętniczego (np.ToF), niedrożności dwunastnicy, oraz rzadkich wad jak skrócenie kości, syndaktylie i klinodaktylie, nieprawidłowe osadzenie stóp, wady nerek, rozszczepy podniebienia, hyperteloryzm, a w badaniu 3D nisko osadzone i zrotowane małżowiny uszne i nieprawidłowa nasada nosa [20,21].

Technika BoBs otwiera nowe możliwości regularnego weryfikowania obecności klasycznych MD i ST rutynowo u każdego badanego nią płodu, co ogromnie podnosi jej wartość. Stwarza ogromne szanse na potwierdzenie zaburzeń, które ujawniłyby się ultrasonograficznie dopiero w III trymestrze ciąży, lub postnatalnie.

Obowiązujące rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego nie wykluczają cytogenetycznych badań molekularnych w diagnostyce prenatalnej [22], zatem należałoby rozważyć wprowadzenie do rutynowej diagnostyki przesiewowej także najbardziej obiecującej obecnie techniki BACs-on-BEADS™.

Wnioski

1. Wstępne wyniki naszych badań wskazują, że technika BoBs okazała się wysoce przydatną w diagnostyce prenatalnej wykrywając wszystkie z wyjątkiem poliploidii aberracje wykrywane techniką klasyczną.
2. Najważniejszymi zaletami techniki jest bardzo krótki czas badania, niski koszt i prostota wykonania przy znacznie większym spektrum diagnostycznym, oraz możliwość wykorzystania do innych celów.

Piśmiennictwo

1. Weise A, Liehr T. Rapid Prenatal Aneuploidy Screening by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). *Methods Mol Biol.* 2008, 444, 39-47.
2. Zimmermann B, Dudarewicz L. Real-Time Quantitative PCR for the Detection of Fetal Aneuploidies. *Methods Mol Biol.* 2008, 444, 95-109.
3. Rosello M, Ferrer-Bolufer I, Monfort S, [et al.]. Prenatal study of common submicroscopic "genomic disorders" using MLPA with subtelomeric/microdeletion syndrome probe mixes, among gestations with ultrasound abnormalities in the first trimester. *Eur J Med Genet.* 2010, 53, 76-79.
4. Hochstenbach R, Moijer J, van den Brug J, [et al.]. Rapid detection of chromosomal aneuploidies in uncultured amniocytes by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Prenat Diagn.* 2010, 25, 1032-1039.
5. Shaeffer A, Chung J, Heretis K, [et al.]. Comparative genomic hybridization - array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am J Hum Genet.* 2004, 74, 1168-1174.
6. Kaluzewski B, Constantinou M, Zajac E. Molecular cytogenetic techniques in detecting subtle chromosomal imbalances. *J Appl Genet.* 2003, 44, 539-546.
7. Fuchs K, Peipert J. First trimester down syndrome screening: public health implications. *Semin Perinatol.* 2005, 29, 267-271.
8. Nicolaidis K. Screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2003, 21, 313-321.
9. Piotrowski K, Zajączek S. Prenatalna Diagnostyka Molekularna Chorób i Zespołów Genetycznych. W: Diagnostyka prenatalna z elementami perinatologii. Red. Wielgoś M. *Via Medica*, 2009, 17-30.
10. Piotrowski K, Constantinou M, Patalan J, [et al.]. Prenatal diagnosis of rare fetal anomalies - case report. *Ginekol Pol.* 2011, 82, 541-546.
11. Faas B, Nillesen W, Vermeer S, [et al.]. Detection of cryptic subtelomeric imbalances in fetuses with ultrasound abnormalities. *Eur J Med Genet.* 2008, 51, 511-519.
12. Vermeesch J, Fiegler H, de Leeuw N, [et al.]. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet.* 2007, 15, 1105-1114.
13. ACOG committee Opinion No446: array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol.* 2009, 114, 1161-1163.
14. Vllard 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.
15. Bocian Ewa. Diagnostyka cytogenetyczna chorób genetycznych. Kryteria i zasady procedury diagnostycznej systemu kontroli jakości badań. *Diagn. Labor.* 2001, 37, 13-45.
16. Ogur G, Gül D, Ozen S, [et al.]. Application of the "Apt Test" in prenatal diagnosis to evaluate the fetal origin of blood obtained by cordocentesis results of 30 pregnancies. *Prenat Diagn.* 1997, 17, 879-882.
17. Hsu L, Perlis T. United States survey on chromosome mosaicism and pseudomosaicism in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 1984, 4, 97-130.
18. Piotrowski K, Henkelman M, Rylów M. Assessment of resolution of molecular mosaic aneuploidy detection in molecular karyotyping technique BACs-on-BEADSTM system. *Doniesienie zjazdowe. Chromosomal Research.* 2011, 19, 221.
19. Submicroscopic chromosomal abnormalities and the chromosomal phenotype w Oxford Desk Reference, Clinical Genetics; Edition by Helen V. Firth and Jane A. Hurst. *Oxford University Press.* 2005, 546-550.
20. Le Caignec C, Boceno M, Saugier-Verber P, [et al.]. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet.* 2005, 42, 121-128.
21. Gilbert-Barnes Enid. Congenital Malformation of the Heart in Potters Pathology of the Fetus, Infant and Child; Second Edition by Enid Gilbert-Barnes. *Mosby Elsevier*, Philadelphia. 2007, 978-1023.
22. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Genetycznego dotyczące postępowania w zakresie diagnostyki prenatalnej. *Ginekol Pol.* 2009, 80, 390-393.