

Zastosowanie metody porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH) w diagnostyce prenatalnej

**Kurs: „Badania genetyczne w diagnostyce prenatalnej”
26.06.2020**

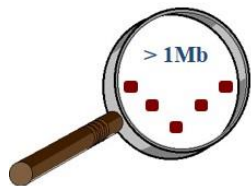
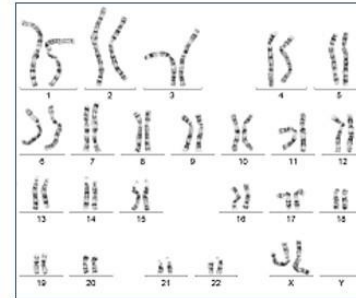
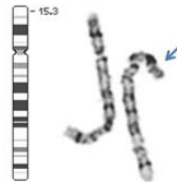
Katarzyna Kowalczyk (Sobecka)
Zakład Genetyki Medycznej
Zespół Pracowni Cytogenetyki IMiD

w zastępstwie
Magdalena Bartnik-Głaska

Analiza całogenomowa

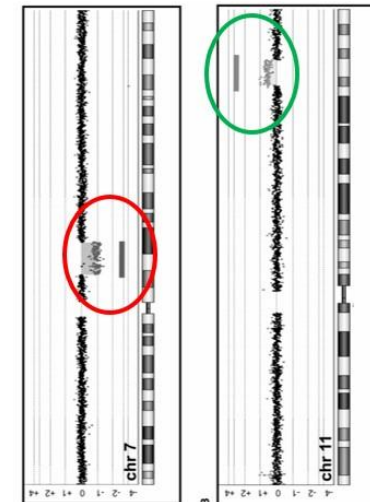
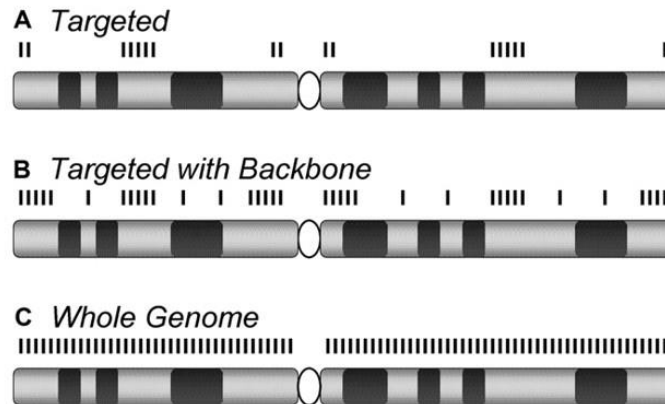
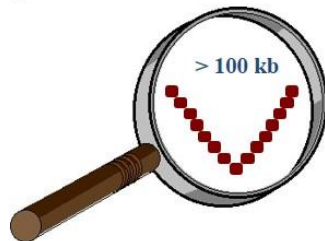


Klasyczna ocena kariotypu



Postęp w technikach cytogenetyki molekularnej

Zastosowanie mikromacierzy do molekularnej oceny kariotypu



Miller i wsp., 2010, *The American Journal of Human Genetics* 86:749–764

Aberracje chromosomowe

liczbowe

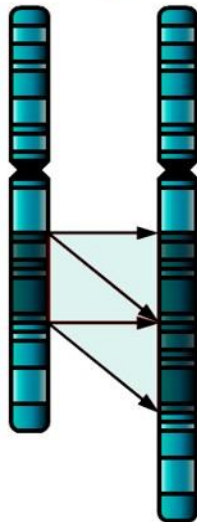
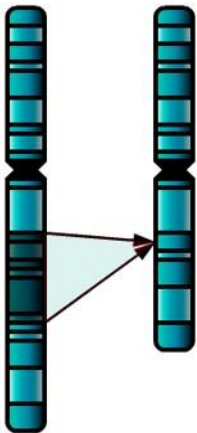
strukturalne

zrównoważone

niezrównoważone

delecja

duplikacja



delecje

Utrata fragmentu chromosomu

duplikacje

Zwielokrotnienie fragmentu chromosomu

mikrodelecje

mikroduplikacje

Submikroskopowe niezrównoważenia genomu

Copy-number variants (CNVs)



Polskie Towarzystwo Ginekologów i Położników **Polish Society of Gynecologists and Obstetricians** (dawniej Polskie Towarzystwo Ginekologiczne)

Rekomendacje dotyczące postępowania w zakresie diagnostyki prenatalnej

1. Wszystkie kobiety ciężarne powinny mieć zaproponowane przesiewowe badania prenatalne
2. Badania inwazyjne powinny być wykonane po uprzednich badaniach przesiewowych
3. Badania przesiewowe określają ryzyko wystąpienia aberracji chromosomowych. Kobietom, które decydują się na pominięcie etapu skriningowego, należy umożliwić wykonanie badania inwazyjnego po uprzednim poinformowaniu o możliwych powikłaniach.
4. Badania przesiewowe: ultrasonografia między 11 a 13 tygodniem ciąży, ultrasonografia między 18 a 24 tygodniem ciąży oraz badania biochemiczne I i II trymestru ciąży umożliwiają poza oceną ryzyka wystąpienia aberracji chromosomowych, także rozpoznanie wielu wad wrodzonych u płodu, ocenę kosmówkowości w ciąży wielopłodowej, a także ocenę ryzyka wystąpienia niektórych powikłań charakterystycznych dla II i III trymestru ciąży.



Contents lists available at ScienceDirect
European Journal of Medical Genetics
journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmg>



Review

Implementation of genomic arrays in prenatal diagnosis: The Belgian approach to meet the challenges



Olivier Vanakker^a, Catheline Vilain^d, Katrien Janssens^b, Nathalie Van der Aa^b,
Guillaume Smits^d, Claude Bandelier^h, Bettina Blaumeiser^b, Saskia Bulk^g,
Jean-Hubert Caberg^g, Anne De Leener^d, Marjan De Rademaeker^c, Thomy de Ravel^f,
Julie Desir^c, Anne Destree^c, Annelies Dheedene^a, Stéphane Gaillez^g, Bernard Grisart^c,
Ann-Cécile Hellin^g, Sandra Janssens^a, Kathelijn Keymolen^c, Björn Menten^a,
Bruno Pichon^d, Marie Ravoet^h, Nicole Revencu^h, Sonia Rombout^c, Catherine Staessens^c,
Ann Van Den Bogaert^c, Kris Van Den Bogaertⁱ, Joris R. Vermeeschⁱ, Frank Kooy^b,
Yves Sznajder^h, Koen Devriendt^{i,*}



The American College of
Obstetricians and Gynecologists
WOMEN'S HEALTH CARE PHYSICIANS



Society for
Maternal-Fetal
Medicine

COMMITTEE OPINION

Number 682 • December 2016

(Replaces Committee Opinion Number 581, December 2013)

Committee on Genetics
Society for Maternal-Fetal Medicine

This Committee Opinion was developed by the American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Genetics in collaboration with committee members Neeta L. Vora, MD; Stephanie T. Romero, MD; and Steven J. Ralston, MD, MPH, and the Society for Maternal-Fetal Medicine's Publication Committee in collaboration with Lorraine Dugoff, MD, and Jeffrey A. Kuller, MD. This document reflects emerging clinical and scientific advances as of the date issued and is subject to change. The information should not be construed as dictating an exclusive course of treatment or procedure to be followed.

**Microarrays and Next-Generation Sequencing
Technology: The Use of Advanced Genetic Diagnostic
Tools in Obstetrics and Gynecology**

Europejskie Rekomendacje

Zalecenia American College of Obstetricians and Gynecologists



Fundusze
Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl

Europejskie Rekomendacje

Porada genetyczna przed wykonaniem badania

- Poinformowanie przyszłych rodziców o możliwościach i ograniczeniach technicznych metody
- Poinformowanie o możliwości stwierdzenia zmiany która NIE zostanie uwzględniona w wyniku (VOUS, CNV o zmiennej ekspresji, penetracji, zmiany patogenne które nie mają wpływu na nieprawidłowy obraz USG)
- Nie można wymagać od rodziców podjęcia natychmiastowej decyzji – ulotki
- Wykonywane u wszystkich pacjentek, nawet dla ciąż o niskim ryzyku (1.7%)

Reporting policy

Czyli co i kiedy uwzględniamy w wyniku badania

- Zmiana *de novo* lub odziedziczona od chorego rodzica
- Region delecji/duplikacji zawiera geny lub cały region opisany jest jako patogenny w bazie DECIPHER
- Region delecji/duplikacji nie znajduje się na liście wariantów polimorficznych (baza DGV)
- TYLKO ZMIANY O ZNANEJ PATOGENNOŚCI!

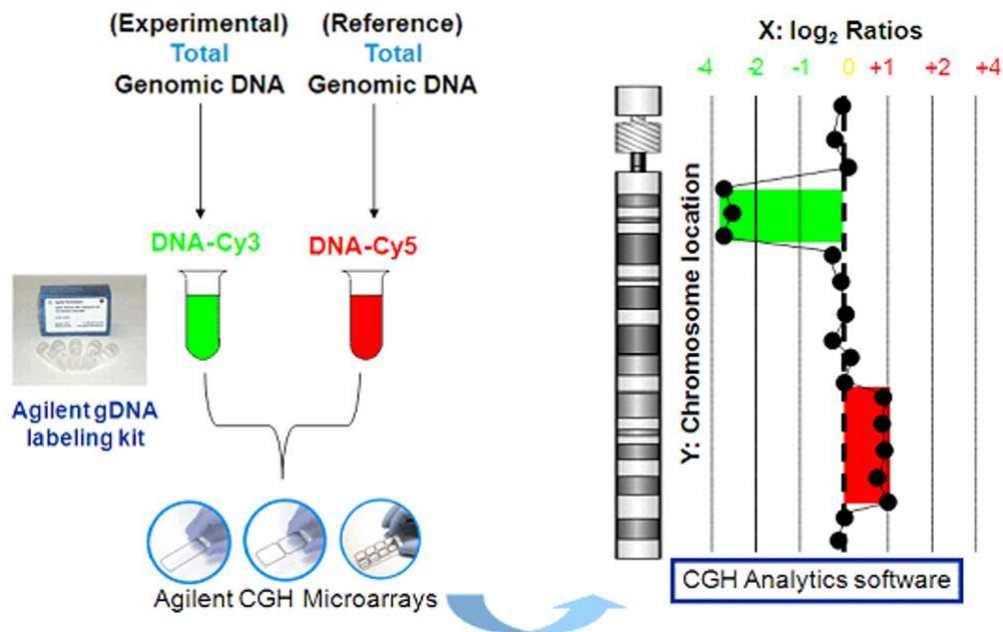
Etapy diagnostyki prenatalnej:

1. Badanie ultrasonograficzne pomiędzy 11 a 13 tyg ciąży
2. Badanie biochemiczne w I trymestrze ciąży (test PAPP-A, test potrójny)
3. Komputerowa ocena ryzyka aberracji chromosomowych u płodu na podstawie testów przesiewowych
4. Podjęcie decyzji o włączeniu pacjentki do dalszych etapów postępowania diagnostycznego
5. W przypadku określenia wysokiego ryzyka aberracji chromosomowych po przeprowadzeniu testów przesiewowych, należy skierować ciężarną do poradni specjalistycznej
6. Przeprowadzenie procedur inwazyjnych oraz wykonanie badań genetycznych

Materialy i metody:

- Metoda porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH) umożliwia wykrycie zmian o charakterze niezrównoważonym u płodów ze stwierdzonymi wadami w badaniu USG
- Metoda ta nie wykrywa poliploidii, utraty heterozygotyczności nie związanej ze zmianą liczby kopii DNA, zrównoważonych translokacji, inwersji i mozaikowości niewielkiego stopnia. Ponadto, nie identyfikuje mutacji punktowych oraz disomii jednorodzicielskiej
- W badaniach wykorzystano macierz całogenomową firmy Oxford Gene Technology v2 lub v3, zaprojektowana według kryteriów konsorcjum ISCA
- Metoda aCGH pozwala na analizę całego genomu w jednym badaniu z średnią rozdzielczością ~120 kp

Metoda:



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



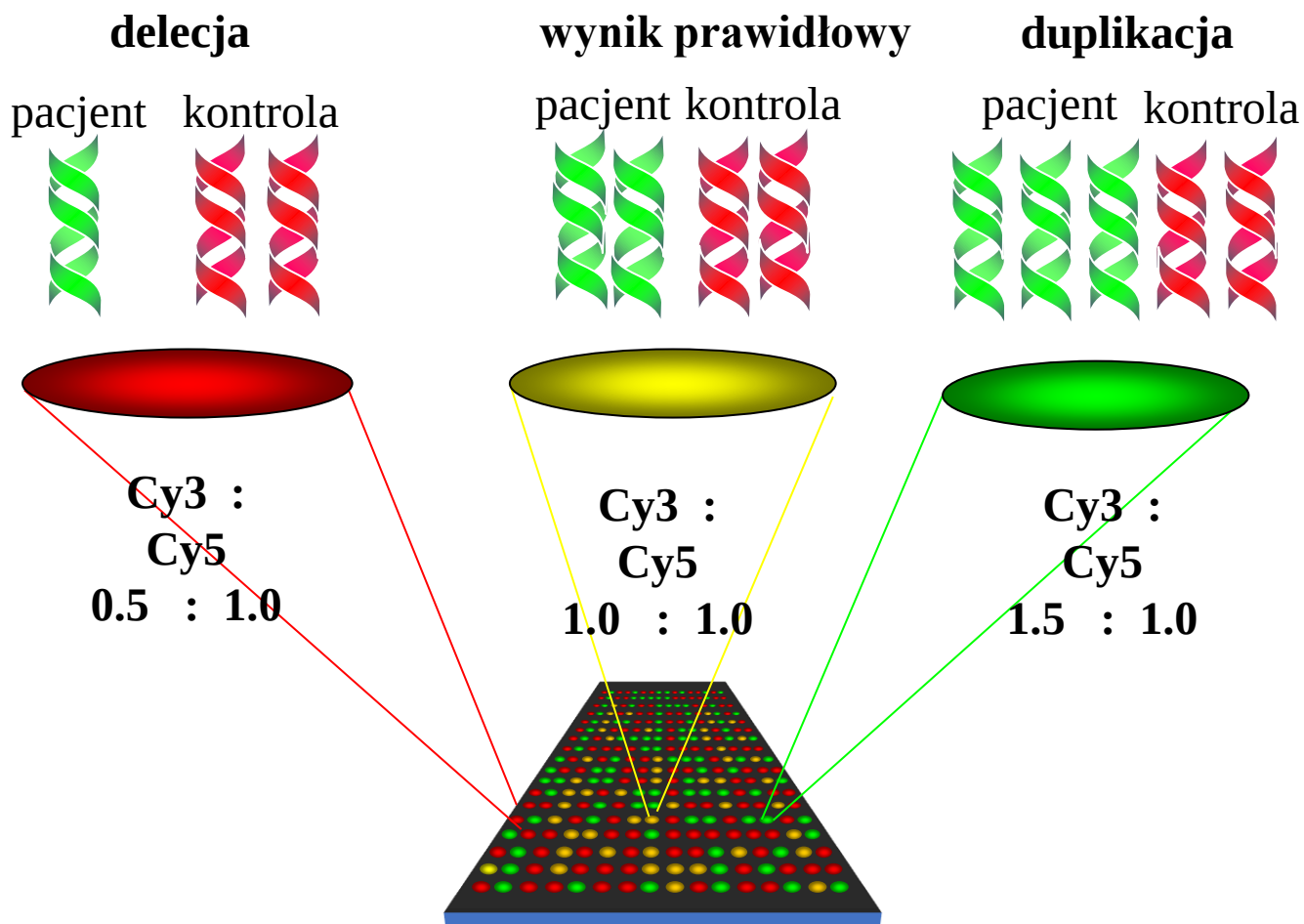
Institut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl

Zasada metody mikromacierzy (aCGH)



Doświadczenia własne - badania wykonane w Instytucie Matki i Dziecka w Warszawie:

- Czas oczekiwania na wynik 3-5 dni
- **Zawsze wykonywana jest 1 hodowla (wykluczenie ploidii 69,XXX oraz translokacji zrównoważonych)**
- CytoSure™ Constitutional v2 oraz v3(8x60k) firma Oxford Gene Technology (mikromacierz całogenomowa celowana na ważne geny).
- **W wyniku uwzględnione tylko zmiany o znanym znaczeniu klinicznym**
 - **Zmiany o nieznanym znaczeniu klinicznym** (variants of unknown clinical significant **VOUS**, *de novo* lub odziedziczone) – 1,5% przypadków (uwzględnione w świadomej zgodzie na badanie)

Dotychczasowe wyniki

	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	SUMA
Wyniki	71	195	398	733	1191	1710	580	4878
Prawidłowe	51	142	276	522	854	1173	407	3425 (70%)
Nieprawidłowe	17	51	110	190	321	525	166	1380 (28%)
Nieinformatywne	3	2	12	21	16	12	7	73 (1,5%)

Wyniki

Wszystkie wyniki: **4878**

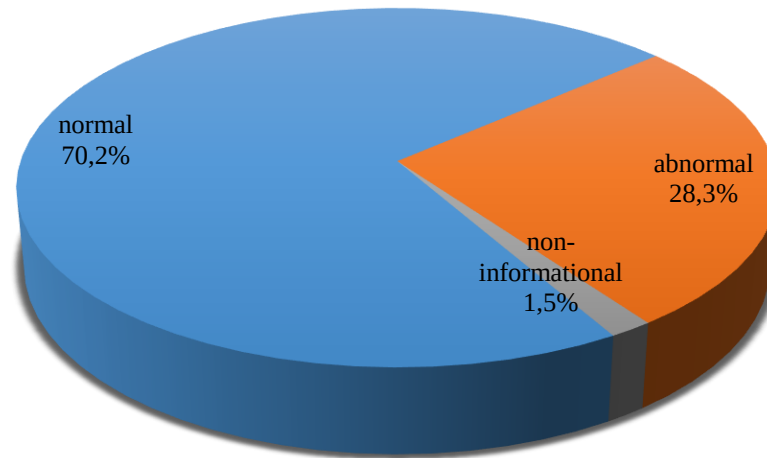
Prawidłowe: 3425

Nieprawidłowe: 1380

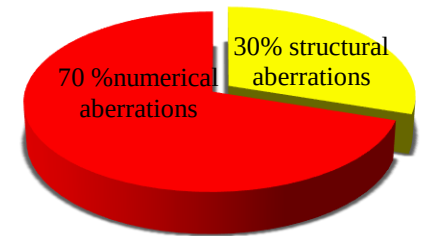
Aberracje liczbowe: 977

Aberracje strukturalne: 406

Nieinformatywne wyniki: 73



■ normal ■ abnormal ■ non-informational

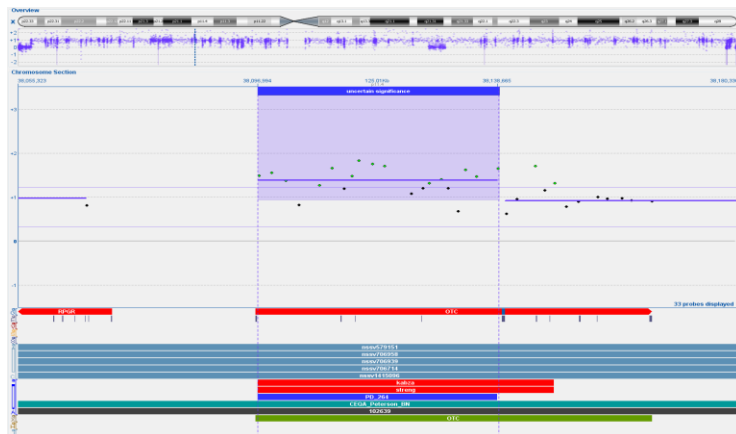


Wskazania do badania:

Wskazania do badania	Wyniki prawidłowe	Wyniki nieprawidłowe	Aberracje liczbowe/strukturalne	Wyniki nieinformatywne
NT, PAPP, Wiek, Obawy	952	315	265	16
			50	
Obciążony wywiad rodzinny	25	6	1	-
			5	
Wadu układu moczowego	82	10	2	-
			8	
Wady OUN	125	25	6	-
			19	
Przepuklina pępowinowa	48	19	18	3
			1	
Uogólniony obrzęk płodu	45	30	24	2
			6	
Hipotrofia płodu	39	15	9	-
			6	

Wskazania do badania	Wyniki prawidłowe	Wyniki nieprawidłowe	Aberracje liczbowe/strukturalne	Wyniki nieinformatywne
Wytrzewienie	11	1	1	-
			-	
Achondroplazja	3	-	-	-
			-	
Wady twarzoczaszki	82	17	13	-
			4	
Wielowadzie	792	356	265	11
			91	
Wady układu kostnego	29	7	3	-
			4	
Wady serca	798	321	229	1
			92	
Weryfikacja innych badań	65	29	3	3
			26	

Wskazania: NT, test PAPP-a, Obawy



- Wskazania do badania: obciążony wywiad rodzinny
- Duplikacja krótkiego ramienia chromosomu X w prążku X p11.4 o wielkości ~ 51 kpz
- Duplikacja obejmuje 6 eksonów genu *OTC* (OMIM: 300461)
- Aberracje i mutacje w tym genie opisywane są u pacjentów z hiperamonemią i mogą być dziedziczone od rodziców niewykazujących objawów klinicznych



- Wskazania: Nieprawidłowy wynik testu PAPPA, nieprawidłowy wynik testu NIFTY (T21).
- Stwierdzono 5 aberracji strukturalnych długiego ramienia chromosomu 21: duplikacji regionu 21q21.1q22.11 o wielkości ~14,3 Mpz, duplikacji regionu 21q22.11q22.13 o wielkości ~2,46 Mpz, duplikacji regionu 21q22.2 o wielkości ~240 kpz, duplikacji regionu 21q22.3 o wielkości ~3,29 Mpz oraz duplikacji regionu 21q22.3 o wielkości ~570 kpz.
- Analiza chromosomów metodą GTG uzyskanych z hodowli komórkowej wykazała, że aberracje zlokalizowane są w obrębie krótkiego i długiego ramienia jednego z chromosomów 21 pary.

Wskazania: wada układu moczowego

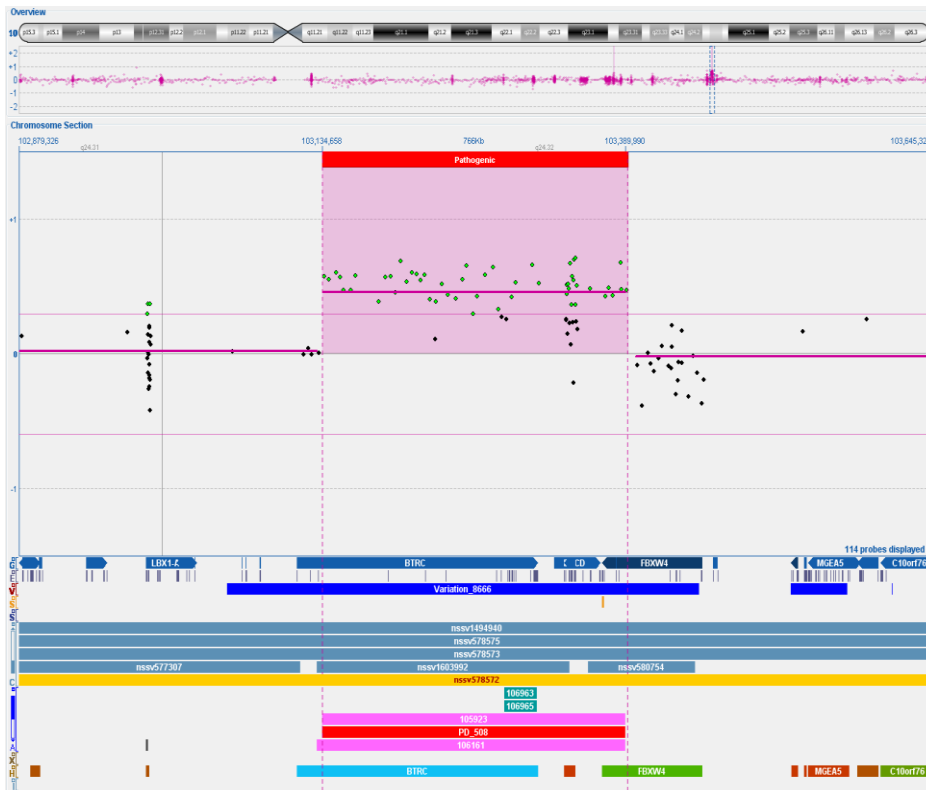


- Wskazania do badania: megacystis
- Duplikacja długiego ramienia chromosomu 18 w regionie 18q21.31 o wielkości ~1,17 Mpz.
- Aberracja obejmuje geny: *ST8SIA3* (OMIM 609478), *ONECUT2* (OMIM 604894), *FECH* (OMIM 108410), *ATP8B1* (OMIM 602397) oraz eksony 1-11 genu *NEDD4L* (OMIM 606384)



- Wskazania: wielotorbielowatość nerek
- Delecja długiego ramienia chromosomu 17 w regionie 17q12 o wielkości ~1,4 Mpz.
- Aberracja obejmuje region znanego zespołu RCAD (OMIM: 137920), opisywanego u pacjentów m. in. z cukrzycą typu MODY oraz nieprawidłowościami układu moczowo-płciowego, w tym torbielowatością nerek

Wskazania: wady kończyn



- Wskazania do badania: wady dłoni i stóp u płodu

Wyniki:

- Kariotyp żeński
- Duplikacja długiego ramienia chromosomu 10 w regionie 10q24.32 o wielkości ~ 255 kpz. Duplikacja obejmuje geny *POLL* (OMIM 606343), *DPCD* (OMIM 616467) oraz częściowo geny *BTRC* (OMIM 603482), *FBXW4* (OMIM 608071) i znajduje się w regionie zespołu duplikacji 10q24 (OMIM 246560)
- Badania rodziców metodą aCGH wykazały, że stwierdzona aberracja jest pochodzenia ojcowskiego
- Duplikacje tego regionu opisywane były u pacjentów z wadami kończyn

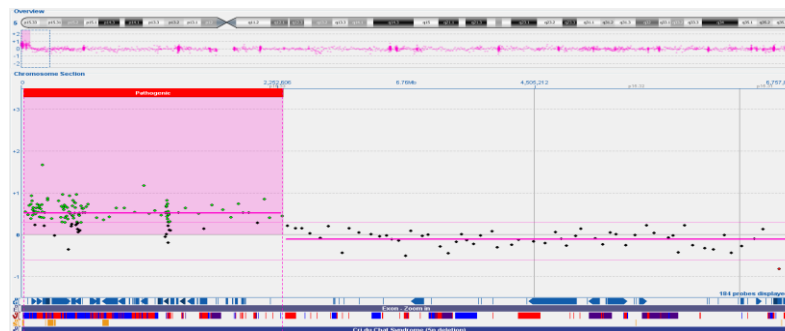
Wskazania: wada OUN i mózgu



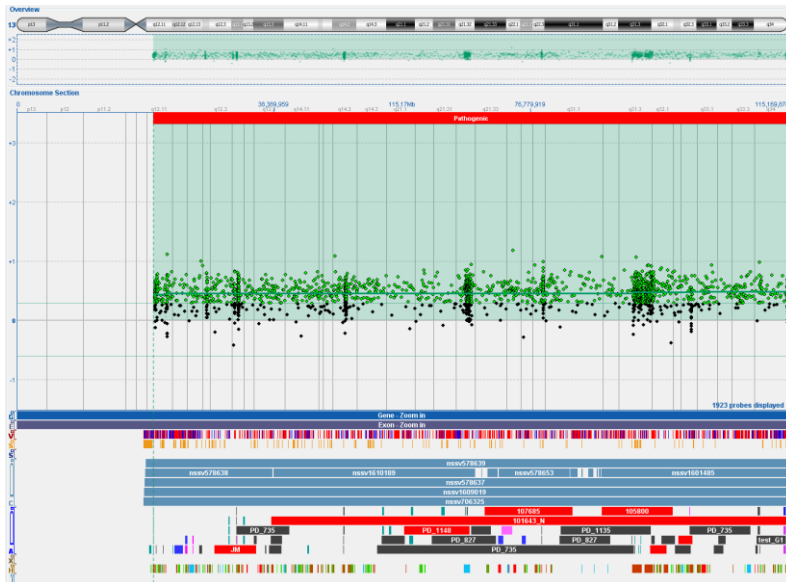
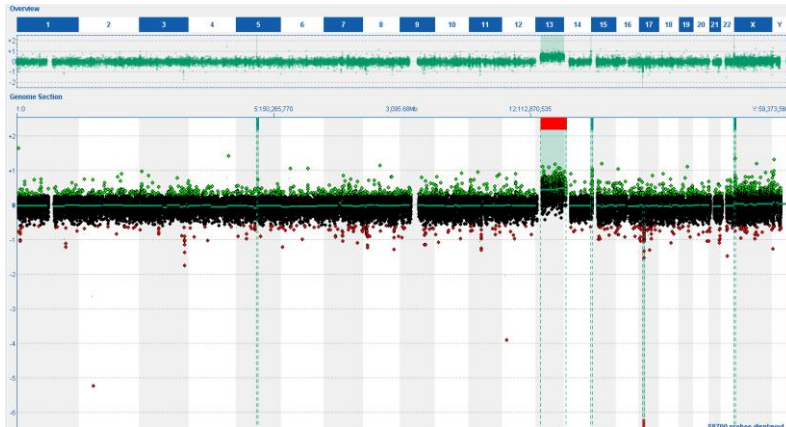
- Wskazania do badania: Izolowany brak jamy przegrody przezroczystej w mózgu
- Delecja długiego ramienia chromosomu 2 w regionie 2q24.3 o wielkości 1,08 Mbp oraz delecja długiego ramienia chromosomu 2 w regionie 2q36.3 o wielkości 1,39 Mbp.
- Delecja 2q24.3 obejmuje gen *FIGN* (OMIM: 605295) natomiast delecja 2q36.3 obejmuje geny: *PID1* (OMIM: 612930), *DNER* (OMIM: 607299), *FBXO36* (OMIM: 609105) oraz wrażliwy na dawkę gen *TRIP12* (OMIM: 604506).



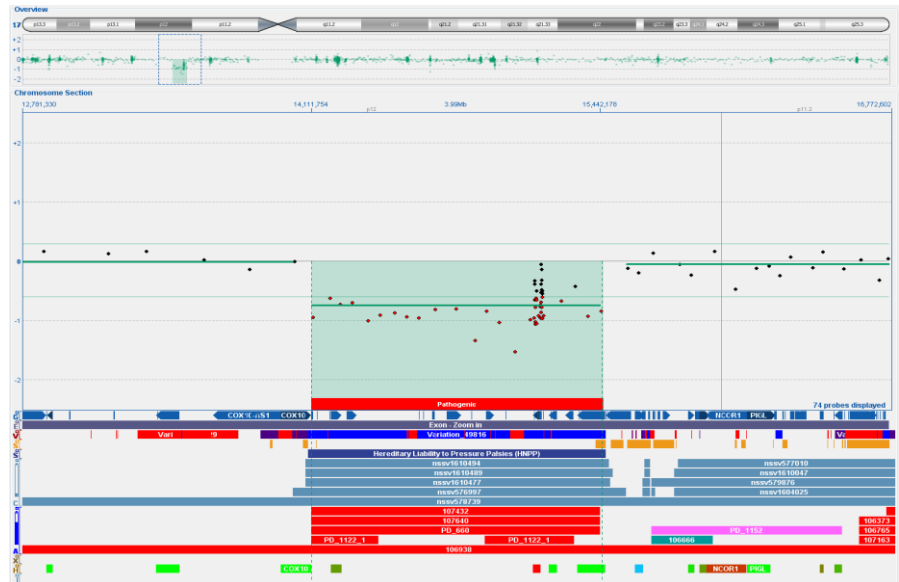
- Wskazania do badania: wentrikulomegalia
- Delecja krótkiego ramienia chromosomu 1 w regionie 1p36.3p36.22 o wielkości ~ 8,84 Mbp oraz duplikacja krótkiego ramienia chromosomu 5 w regionie 5p15.33 o wielkości ~2,25 Mbp.



Wskazania: wielowadzie

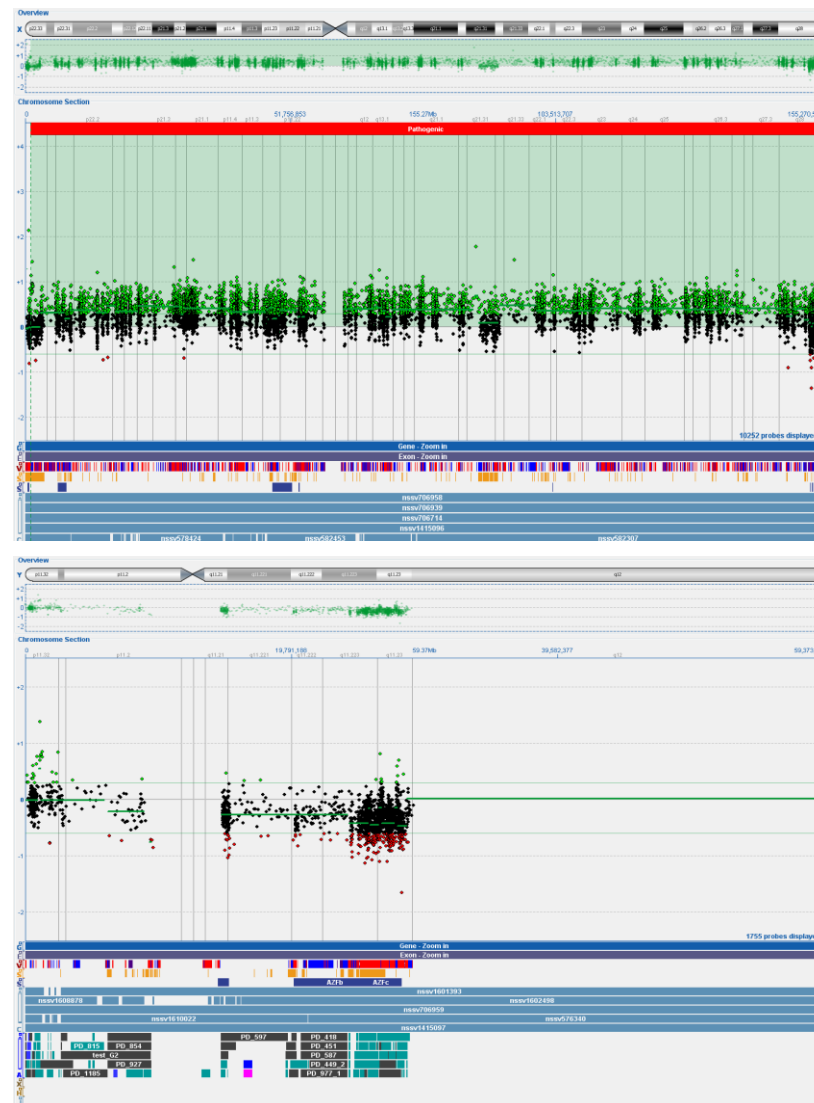


- Wskazania do badania: obustronny rozszczep wargi, stopy końsko-szpotawe, w teście PAPP-a wysokie ryzyko T13
- Kariotyp męski,
- Trisomia chromosomu 13
- Dodatkowo w badaniu stwierdzono delecję krótkiego ramienia chromosomu 17 w prążku 17p12 o wielkości ~ 1,33 Mbp.
- Delecja obejmuje region krytyczny dziedzicznej neuropatii z nadwrażliwością na ucisk (HNPP) (OMIM: 162500)
- Delecja 17p12 została potwierdzona badaniem metodą FISH
- Badania rodziców metodą FISH wykazały, że stwierdzona u płodu delecja 17p12 jest pochodzenia matczynego



Wskazania do badania: wielowadzie, uogólniony obrzęk płodu

- Karyotyp męski
- Profil intensywności sygnału fluorescencji dla chromosomu X w uzyskanym wyniku badania, sugeruje obecność dodatkowego chromosomu X, która może wynikać z dużej domieszki materiału pochodzenia matczynego, faktycznej obecności dodatkowego chromosomu X lub poliploidii.
- Wynik: 69,XXY



Wskazania do badania: tetralogia Fallota

- Kariotyp męski
- Delecja długiego ramienia chromosomu 22 w regionie 22q11.21 o wielkości $\sim 2,56$.
- Delecja znajduje się w regionie znanego zespołu mikrodelecji 22q11.2 (OMIM: 188400)
- Badania metodą MLPA (P245-B1) u rodziców wykazały, że aberracja stwierdzona u płodu jest pochodzenia ojcowskiego



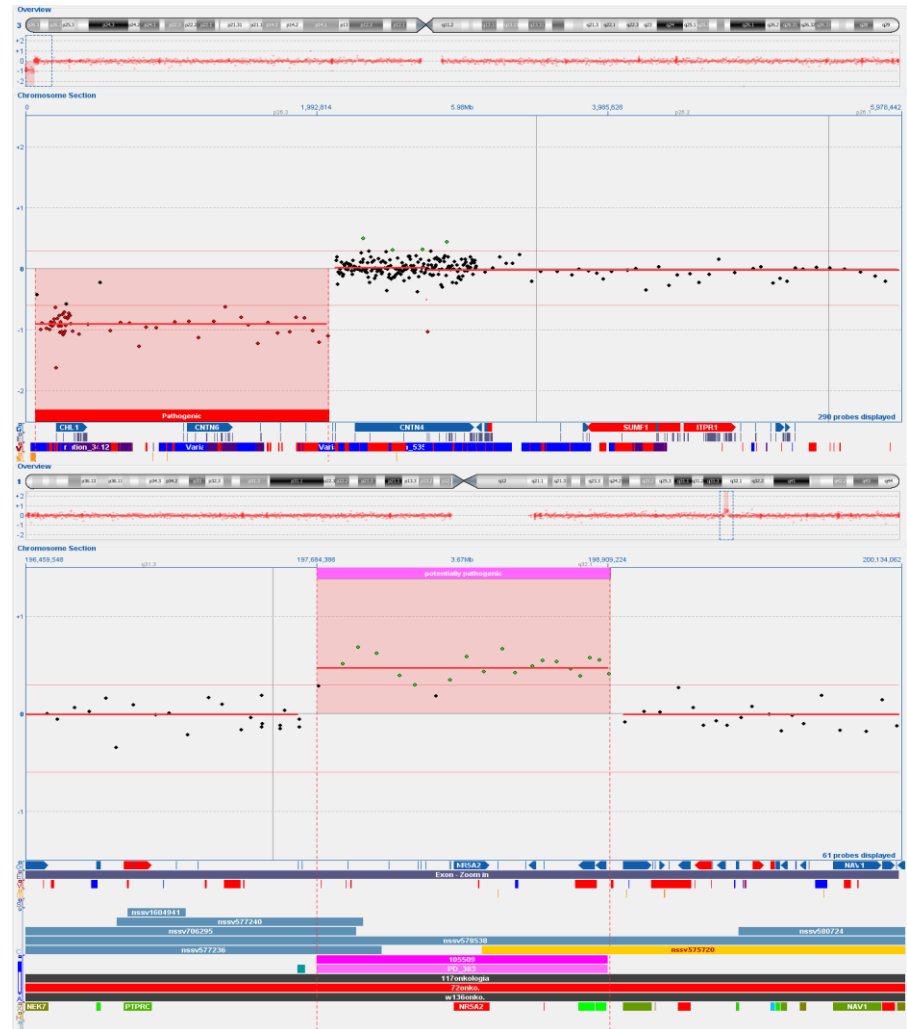
Wskazania do badania: VSD

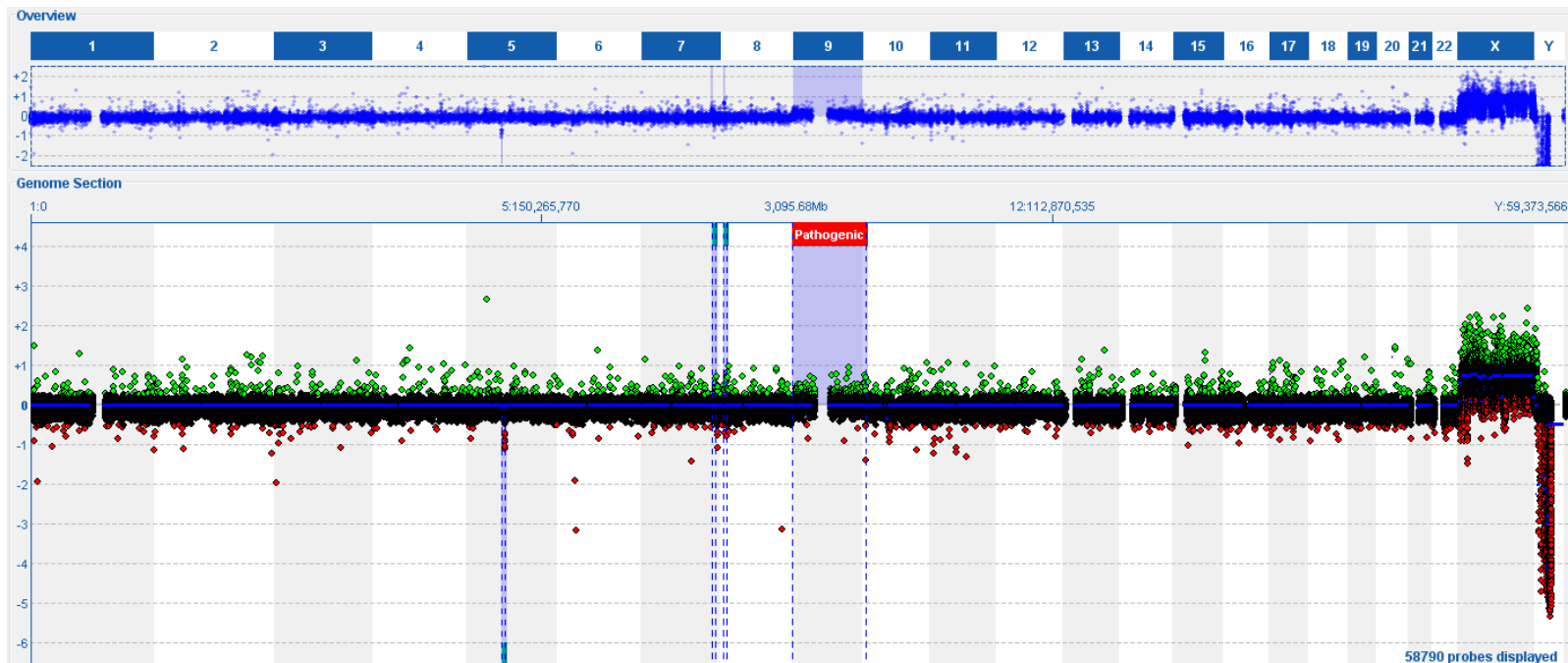
- Kariotyp męski
- Delecja długiego ramienia chromosomu 12 w regionie 12q14.1q15 o wielkości $\sim 10,27$ Mbp.
- Aberracja obejmuje wiele genów oraz region znanego zespołu mikrodelecji 12q14



Wskazania do badania: ARSA

- Kariotyp męski,
- Duplikacja długiego ramienia chromosomu 1 w prążku 1q32.1 o wielkości ~1,22 Mbp
- Duplikacja 1q32.1 obejmuje 4 geny: *DDX59* (OMIM: 615464), *KIF14* (OMIM: 611279), *ZNF281* i wrażliwy na dawkę gen *NR5A2* (OMIM: 604453). Mutacje w genie *KIF14* opisywane są u pacjentów z Syndromem Meckel (OMIM: 616258)
- Dodatkowo w badaniu stwierdzono delecję krótkiego ramienia chromosomu 3 w prążku 3p26.3 o wielkości ~ 1,99 Mbp. Delecja obejmuje dwa geny: *CHL1* (OMIM: 607416) i wrażliwy na dawkę gen *CNTN6* (OMIM: 607220)
- Badania rodziców metodą aCGH wykazały, że stwierdzone u płodu aberracje są pochodzenia matczynego
- Pomimo, że aberracje zostały odziedziczone od matki niewykazującej objawów klinicznych, nie można jednoznacznie wykluczyć ich wpływu na nieprawidłowości stwierdzone w badaniu USG u płodu





Kariotyp żeński, stwierdzono nie zrównoważenie genomu w postaci mozaikowej trisomii chromosomu 9 pary.

Analiza chromosomów po hodowli komórkowej wykazała obecność dwóch linii komórkowych. W 6 na 17 analizowanych komórek stwierdzono obecność dodatkowego chromosomu 9 pary, a w pozostałych 11 analizowanych komórkach stwierdzono prawidłowy kariotyp żeński.

	Klasyczna ocena kariotypu	Mikromacierz CGH
Zasada działania metody	Analiza mikroskopowa wzoru prążkowego chromosomów	Hybrydyzacja DNA pacjenta oraz DNA kontrolnego do sond oligonukleotydowych znajdujących się na szkiełku mikromacierzowym
Rozdzielczość metody	5-10 Mbp	W zależności od stosowanej mikromacierzy: od ~ 0,1 Mbp do 0,01 Mbp
Identyfikacji aberracji zrównoważonych	TAK	NIE
Materiał wykorzystywany do badania	Komórki w stadium metafazy po hodowli komórkowej	DNA izolowane z niehodowanych komórek
Konieczność hodowli	TAK	NIE
Identyfikacja aneuploidii	TAK	TAK
Identyfikacja triploidii	TAK	NIE
Identyfikacja kontaminacji komórkami matczynymi	TAK, ale u płodu męskiego	TAK, ale u płodu męskiego
Identyfikacja kariotypu mozaikowego	TAK	TAK; wykrywa mozaikowość o wysokości ok. 5-10%
Czas potrzebny do uzyskania wyniku	10 dni do 3 tygodni	2-7 dni roboczych



PODSUMOWANIE:

- Mikromacierze są obecnie stosowane jako pierwsze badanie w diagnostyce prenatalnej, w szczególności w przypadkach występowania nieprawidłowości i/lub wad u płodów stwierdzonych w badaniu USG
- Badania prenatalne metodą aCGH wykonane w IMiD pozwoliły na identyfikację aberracji chromosomowych w 28% przypadków z czego 27 % stanowiły aberracje strukturalne niewykrywalne metodą GTG
- W przypadku stwierdzenia u płodu aberracji o nieznanym znaczeniu klinicznym, interpretacja uzyskanego wyniku badania może sprawiać trudności. W takich przypadkach bardzo istotne jest ustalenie pochodzenia stwierdzonej aberracji oraz określenie ryzyka genetycznego w rodzinie

PODZIĘKOWANIA:

Prof. dr hab. Jerzy Bal – **Kierownik Zakładu Genetyki Medycznej IMiD**

Poradnia Genetyczna IMiD

- Dr Ewa Obersztyn
- Dr Anna Kutkowska-Kaźmierczak
- Dr Jennifer Castañeda
- Dr Artur Barczyk
- Dr Natalia Braun-Walicka
- Dr Paweł Własienko

Zespół Pracowni Cytogenetyki IMiD

- Dr Beata Nowakowska
- Dr Magdalena Bartnik-Głaska
- Dr Marta Smyk
- Dr Barbara Wiśniowiecka-Kowalik
- Dr Marta Kędzior
- Mgr Izabela Plaskota
- Mgr Katarzyna Kowalczyk (Sobecka)
- Mgr Magdalena Paczkowska
- Mgr Magdalena Zbiciak
- Mgr Joanna Bernaciak
- Mgr Krystyna Jakubów – Durska
- Róża Magdziak

Dziękuję za uwagę

