

Kvantitativna fluorescenčna verižna reakcija s polimerazo (QF-PCR) kot alternativni test za hitro prenatalno genetsko testiranje

Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) as an alternative test for rapid prenatal genetic testing

Alenka Erjavec Škerget*, Špela Stangler Herodež, Boris Zagradišnik in Nadja Kokalj Vokač

Laboratorij za medicinsko genetiko, Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Univerzitetni klinični center Maribor / Ljubljanska 5, 2000 Maribor.

E-mail: alenka.erjavec@ukc-mb.si

* Alenka Erjavec Škerget; Tel.: +00386 2321 2737;

Povzetek: Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (QF-PCR) z uporabo markerjev specifičnih za kratka ponavljajoča se zaporedja (STR-short tandem repeat), značilna za določen kromosom, je uspešna metoda za hitro diagnosticiranje najpogostejših kromosomskih aneuploidij v prenatalnem obdobju. Namen našega prispevka je predstaviti omenjeno metodo in analizirati naše rezultate po treh letih uporabe QF-PCR kot hitrega testa pri iskanju najpogostejših prenatalnih kromosomskih sprememb: trisomije kromosoma 21, 18, in 13. Genomsko DNA za QF-PCR analizo smo pripravili iz vzorcev amnijskih celic, horionskih resic ali placentarnih celic, ki smo jih pridobili od nosečnic s povišanim tveganjem za rojstvo otroka z katero od najpogostejših prenatalnih kromosomopatij. Za testiranje s QF-PCR metodo smo uporabili 20 različnih STR začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kromosome 13, 18, 21, Y ter amelogeninski X/Y alel. Pri 63.8% vzorcev je obenem bila opravljena še citogenetska analiza v našem laboratoriju zato imamo možnost primerjave obojih rezultatov. V triletnem obdobju smo opravili 243 analiz prenatalnih vzorcev: iz amnijskih celic 72.3%, horionskih resic 27.2%, v dveh primerih smo kot vzorec uporabili celice placentе. Pri 7.8% vzorcev smo s QF-PCR našli kromosomsko aneuploidijo, najpogostejša je bila trisomija kromosoma 21 (3.7%). Zaradi omejitve metode QF-PCR, je ostalo 4.4% kromosomskih sprememb nezaznanih, od le-teh je bila tretjina s slabo klinično prognozo. Senzitivnost metode QF-PCR v naši študiji je bila 95.4%, specifičnost 100% in učinkovitost 98.8%. Dosedanji rezultati kažejo, da je QF-PCR zanesljiva metoda, ki učinkovito pripomore k uspešnemu kliničnemu vodenju nosečnosti kot hitra metoda za zgodnje zaznavanje najpogostejših kromosomskih sprememb pri nosečnicah z visokim tveganjem za fetalno kromosomsko aneuploidijo. Kariotipizacija po invazivni prenatalni diagnostiki se v Sloveniji opravlja pri vseh vzorcih, v nekaterih evropskih državah pa že razmišljajo o uporabi hitrih presejalnih testov kot samostojnih testov pri interpretaciji rezultatov po invazivni prenatalni genetski diagnostiki v določenih primerih.

Ključne besede: kvantitativna fluorescenčna verižna reakcija s polimerazo; QF-PCR; invazivna prenatalna diagnostika; hitri prenatalni test; kromosomske aneuploidije; prenatalno testiranje

Abstract: Diagnosis of common chromosome aneuploidies have been successful through quantitative fluorescent PCR (QF-PCR) assays and small tandem repeats (STR) markers. Our objective was to present and to analyze the results of the first three years of a QF-PCR testing strategy for the prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidy (trisomy of chromosome 21, 18 and 13) and to discuss about the advantages and disadvantages of methodology. Amniotic fluid or chorionic villus samples were collected from mother undergoing prenatal invasive testing for fetal abnormalities on ultrasonic examination or abnormal maternal serum aneuploidy screening results. Rapid diagnoses were performed using QF-PCR analysis with several STRs markers specific for chromosomes 13, 18, 21, Y and amelogenin X/Y alleles. One QF-PCR testing

consisted of six multiplex reactions. Of the 243 samples received (amniotic cells 72.3%, chorionic villi 27.2%, placentocentesis 0.5%) 7.8% had a chromosome abnormality detected by QF-PCR testing. All cases with numerical chromosome aberrations involving chromosomes 21, 18, 13 were correctly diagnosed (100%). Of 66 samples 4.5% of samples received a normal QF-PCR result but subsequently had an abnormal karyotype because the present QF-PCR assay was not designed to detect them. Of these samples only 1/3 had a chromosome abnormality associated with a poor prognosis. Based on our result the sensitivity of the QF-PCR assay was 95.4%, the specificity 100% and the efficiency 98.8%, respectively. Our study demonstrates that QF-PCR is a reliable technique that aids clinical management of pregnancy as rapid method for the detection of common numerical chromosome disorders by woman at high risk for fetal aneuploidy. While karyotyping is still required for all samples in Slovenia, using QF-PCR as a stand-alone prenatal test for pregnancies without ultrasound abnormalities reduces costs, provides rapid delivery of results, and avoids ambiguous and uncertain karyotype results, reducing parental anxiety.

Key words: quantitative fluorescent polymerase chain reaction; QF-PCR; prenatal diagnosis; rapid aneuploidy detection; chromosomal aneuploidy; prenatal testing

1. Uvod

Zlati standard za prenatalno diagnostiko z namenom ugotavljanja številčnih ali strukturnih kromosomskih nepravilnosti je običajno klasična citogenetska analiza, kjer pregledujemo vseh 23 parov kromosomov v metafaznem delu celičnega cikla in kot rezultat dobimo kariotip posameznega vzorca. Omenjena metoda zahteva

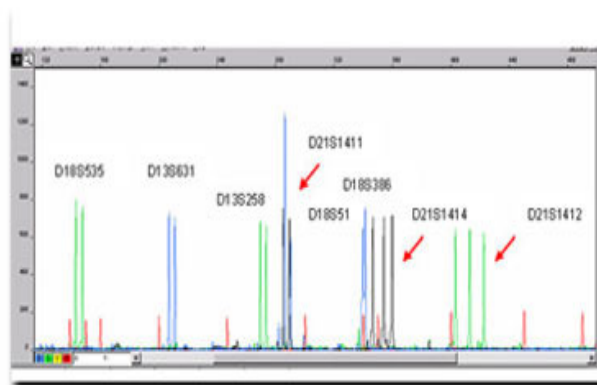
vitalne celice, ki jih običajno moramo še *in vitro* pogojih nadalje gojiti, da čim več celicam zagotovimo prehod v metafazo. Kot vzorec za kariotipizacijo lahko uporabimo celice fetusa, ki jih lahko pridobimo iz njegove krvi, uporabimo lahko tudi amniocite iz amniocenteze ali celice horionskih resic oz. placentarnega tkiva. Ker potrebujejo celice čas za rast, smo z izdajo rezultatov pri kariotipizaciji omejeni. Čas do izdaje izvida po kariotipizaciji je ponavadi 14 do 21 dni, zato obstaja trend iskanja najučinkovitejše, najmanj invazivne, najbolj specifične in dovolj senzitivne metode, ki bi zagotavljala dovolj hitre in zanesljive rezultate pri prenatalnem testiranju.

Dve v zadnjem času najpogosteje uporabljeni tehniki za hitro diagnostiko najpogostejših fetalnih kromosomskih anomalij sta metoda fluorescenčna *in situ* hibridizacija (FISH) in kvantitativna fluorescenčna verižna reakcija s polimerazo (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction- QF-PCR).

Namen našega prispevka je predstaviti metodo QF-PCR in analizirati naše rezultate po treh letih uporabe QF-PCR kot hitrega testa pri iskanju najpogostejših prenatalnih številčnih kromosomskih sprememb pri kromosomih 21, 18, in 13 ter določanju prisotnosti kromosomov Y in X.

1.1. Kvantitativna fluorescenčna verižna reakcija s polimerazo (QF-PCR)

QF-PCR je molekularno genetska tehnika, osnovana na analizi DNA, izolirani iz negojenih fetalnih celic. Osnovni princip QF PCR metode temelji na zaznavanju prisotnosti markerjev za visoko polimorfne kratke tandemске ponovitve- mikrosatelitne- „short tandem repeats“ (STR), značilnih za specifični kromosom (Mansfield, 1993). STR so hipervariabilne regije v genomu, ki vsebujejo 2-7 baznih parov (bp) dolga ponavljajoča se zaporedja. Število alelov, prisotnih v vzorcu, lahko določimo s kvantitativno analizo rezultatov po PCR. Pri QF PCR uporabimo fluorescenčno označene začetne oligonukleotide, specifične za posamezne mikrosatelitne označevalce na kromosomih, ki nas zanimajo. Z njimi izvedemo verižno reakcijo s polimerazo in število prisotnih alelov v preiskovanem vzorcu določimo s kvantitativno analizo rezultatov. V ta namen lahko uporabimo kapilarno elektroforezo. Na elektroforetogramu pregledujemo prisotnost/odsotnost in število posameznih vrhov ter primerjamo njihovo velikost oz. površino pod njimi (slika 1).



Slika 1. Elektroforetogram kot rezultat po kapilarni elektroforezi; kromatografski vrhovi predstavljajo pomnožek PCR ustrezne velikosti, določene s pari

posameznih začetnih oligonukleotidov; z rdečimi puščicami je nakazano patološko stanje: vsi D21S označevalci: trije vrhovi ali dva vrhova v razmerju 2:1= trisomija 21 kromosoma; ostali označevalci (D13S ali D18S) predstavljajo normalno stanje.

2. Materiali in metode

V Laboratoriju za medicinsko genetiko UKC Maribor QF-PCR kot hitri test pri prenatalni diagnostiki uporabljamo od junija 2007. Z njim ugotavljamo prisotnost najpogostejših patoloških kromosomskih sprememb pri fetusu: spremembe v številu kromosomov 21, 18 in 13 ter določanje prisotnosti kromosomov X in Y). Vsi pispeli vzorci so podvrženi analizi z vsemi STR markerji, navedenimi v tabeli 1. Postopek po prihodu prenatalnega vzorca v laboratorij je prikazan v naslednji shemi:

1. Izolacija genomske DNA (iz amniocit, horionskih resic, placentarnega tkiva, periferne venske krvi); s komercialnim kompletom reagentov: Qiagene, po navodilih proizvajalca;
2. Verižna reakcija s polimerazo z uporabo fluorescentnih začetnih oligonukleotidov, QF-PCR reakcije smo pripravljali v 6 reakcijskih mešanica (shema v tabeli 1). Pomnoževanje v grelnem bloku za PCR (Eppendorf Mastercycler gradient, Biometra Gradient) smo izvajali pri naslednjih pogojih: 15 min pri 95°C začetna denaturacija; začetek cikla: 30 sek pri 94°C, 1min 30s pri Ta= 64°C, Ta= 56°C, Ta= 60°C in 1 min pri 72°C. Število ciklov smo prilagajali količini izolirane genomske DNA (običajno 22 ciklov).
3. Kontrolna agarozna gelska EF: 3% agarozni gel. Za analizo smo uporabili 5µl PCR produkta. Elektroforezo smo izvajali 10 min pri 160V napetosti.
4. Kapilarna elektroforeza: količino PCR produkta za kapilarno elektroforezo smo določili s pomočjo slike agaroznega gela. Za kvantitativno analizo enega vzorca smo uporabili štiri kapilare. Kapilarno elektroforezo smo izvedli po navodilih za napravo Beckman-Coulter CEQ8000.
5. Analiza rezultatov in izdaja izvida: v elektroforetogramih, ki smo jih dobili kot rezultat kapilarne elektroforeze, smo identificirali označevalce v posamezni mešanici (slika 1).

Tabela 1. Uporabljeni STR označevalci, vključeni v QF PCR analizo v Laboratoriju za medicinsko genetiko UKC Maribor (označeni z fluorescenčnima barviloma: **modrim**

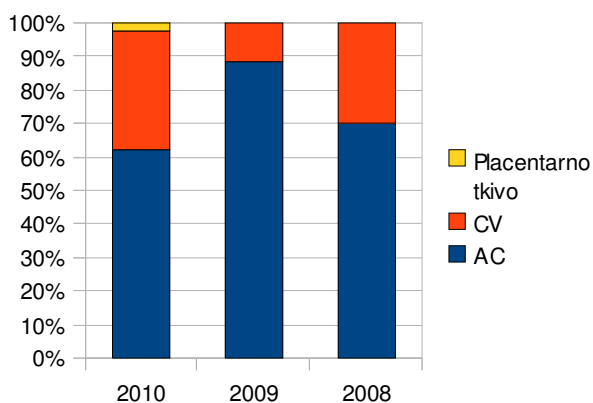
Cy 5 ali **zelenim Cy5.5**); Kratica pomeni ime posameznega markerja, iz katerega je razviden položaj na določenem kromosomu.

Mešanica 1	Mešanica 2	Mešanica 3	Mešanica 4	Mešanica 5	Mešanica 6
D18S391	D18S1002	D13S634	IFNAR	D21S1411	D21S1435
D13S742	D13S258	D18S51	D13S631	ESRY	D21S226
D18S386	D21S1270	D21S11	AMEL	SY70	
D18S535	D13S628	D21S1437			

3. Rezultati in diskusija

3.1. Število analiz po letih in po viru

DNA V letu 2008 smo opravili 81 analiz, od tega 57 vzorcev iz amnijskih celic (AC), v letu 2009 70 analiz, 62 vzorcev iz AC, v prvih devetih mesecih leta 2010 pa smo opravili 95 analiz: 59 iz AC, dva vzorca iz placentarnega tkiva, ostali del predstavljajo celice horionskih resic (CV). Slika 2 prikazuje delež QF-PCR analiz glede na vir DNA po posameznih letih. V našem delu pri 1.2% rezultata ni bilo možno podati zaradi kontaminacije z materino krvjo, kar se ujema z deležem v drugih genetskih centrih: v angleški študiji pri 2.8% vzorcev zaradi istega razloga ni bila možna interpretacija rezultata (Stojilkovic-Mikić).

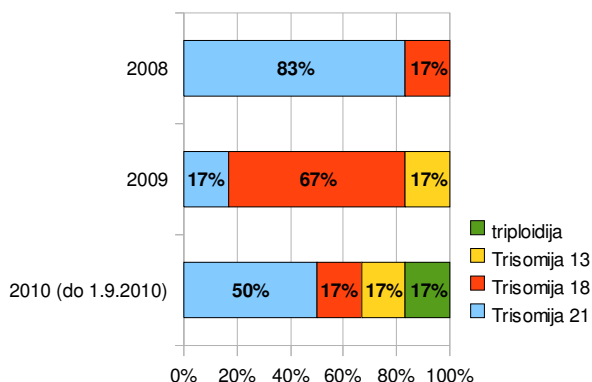


Slika 2. Delež analiz QF-PCR glede na vir DNA po posameznih letih

3.2. Patološki rezultati s QF-PCR po letih in po vrsti patologije

V 92.2% so bili izdani izvidi vzorcev kot nepatološki, kar se tiče pregledanega števila kromosomov 13, 18, 21. V 19 primerih (7.8%) je bila najdena katera od pregledovanih

aneuploidij kromosomov 13, 18, 21. Največ patoloških rezultatov po vseh dosedanjih analizah je na račun trisomij kromosoma 21 (3.7%), sledijo trisomija kromosoma 18 (2.9%), trisomija 13 (0.8%) in triploidija v enem primeru (0.4%). Patološki rezultati po posameznih letih so predstavljeni na sliki 3.



Slika 3. Patološki rezultati po QF-PCR po posameznih letih.

Iz Velike Britanije poročajo o 10.3% deležu najdenih kromosomskih aneuploidij s QF-PCR (Hills, 2010). Najpogostejši vzrok patologije pri njih je trisomija kromosoma 21 (55%), pri nas le-ta predstavlja 47% delež med patološkimi rezultati. Trisomijo kromosoma 18 so v Veliki Britaniji našli pri 22% patoloških rezultatov, pri nas pri 37%. Pri primerjavi deleža trisomij kromosoma 13 med patološkimi rezultati, smo jih našli več, 11%, v primerjavi z Veliko Britanijo, 8%.

3.3. Primerjava števila in rezultatov QF-PCR in karyotipizacije

Rezultate hitrega testa s QF-PCR in karyotipa smo imeli možnost primerjati pri 63.8% vzorcev, obdelanih s QF-PCR. Pri ostalih karyotip ni bil opravljen, ker ni bilo take zahteve, v dveh primerih pa rast celic iz kulture horionskih resic ni bila uspešna. Za primerjavo rezultatov QF-PCR in karyotipizacije smo uporabili podatke iz leta 2010. V tem letu je bilo z obema metodologijama obdelanih 65 vzorcev.

V 32.3% je bil rezultat QF-PCR in karyotipa normalni ženski spol, XX. V 56.9% je bil rezultat QF-PCR in karyotip normalni moški spol, XY. S QF-PCR smo našli in s karyotipom potrdili vse ciljano iskane številčne kromosomske spremembe (6.2%): trisomijo kromosoma 13 (1 primer), trisomijo kromosoma 18 (2 primera) in trisomijo kromosoma 21 (1 primer, v dveh primerih najdene trisomije karyotip ni bil naročen). Pri treh vzorcih (4.6%) je bil izvid QF-PCR izdan kot normalni izvid, s komentarjem brez odstopanj. Po karyotipizaciji se je pokazalo, da je:

- pri enem primeru bila v 8/112 (7.1%) celic najdena trisomija kromosoma 8;
- pri enem primeru bila v 65 % pregledanih celic najdena trisomija kromosoma 7;
- pri enem primeru bila v vseh celicah najdena pericentrična inverzija kromosoma 5.

Omenjenih treh primerov s QF-PCR nismo zaznali zaradi zasnove samega testa, s katerim je sicer možno samo ciljano iskanje številčnih kromosomskih sprememb.

Na podlagi naših rezultatov ugotavljamo, da je ujemanje rezultatov karyotipa in s QF-PCR najdenih navedenih številčnih kromosomskih sprememb ter prisotnosti kromosomov X in Y popolno, torej 100%.

V primerjavi z rezultati karyotipa smo z QF-PCR zaznali 95.4% od vseh s karyotipom najdenih kromosomskih sprememb. Podatki o zaznavanju, kolikšen delež kromosopatij lahko odkrijemo s QF-PCR, so različni v različnih objavah: v študiji iz leta 2004, opravljeni na 1500 vzorcih, poročajo o zaznanih 95% klinično značilnih kromosomskih sprememb (Leung, 2004), Caine (2005) poroča o 70% deležu zaznanih, Hills (2010) o 89% zaznanih sprememb. V češki populaciji so s QF-PCR zaznali 92% vseh kromosomskih sprememb (Putzova, 2008), iz Španije poročajo o 98.75% deležu (Badenas, 2010).

4. Zaključki

V prispevku smo pripravili pregled triletnega dela z metodo QF-PCR in primerjali rezultate po QF-PCR in karyotipizaciji. Ugotovili smo, da QF-PCR metoda s 100% specifičnostjo zazna najpogostejše kromosomske aneuploidije, ki vključujejo kromosome 21, 18, 13, ter prisotnost kromosomov X in Y. Omenjeni rezultati dokazujejo, da je QF-PCR dovolj senzitivna in specifična metoda. Po nekaterih objavah bi v določenih primerih lahko QF-PCR uporabili kot samostojni in edini presejalni test za iskanje najpogostejših kromosomskih aneuploidij v prenatalnem obdobju (Hills, 2010). Tako v Sloveniji, kot še v večini evropskih držav pa veljajo priporočila, da naj bi vsakemu hitremu testu sledila še karyotipizacija po dolgotrajni kulturi (Leung, 2004, Association, 2007).

Literatura

1. Association for Clinical Cytogenetics and Clinical Molecular Genetics Society. 2007. QF-PCR for the Diagnosis of Aneuploidy: Best Practice Guidelines v2.01 http://www.cmgs.org/BPGs/pdfs_current/bpgs/QFPCR.pdf
2. Caine A, Maltby AE, Parkin CA, Waters JJ, Crolla JA. UK Association of Clinical Cytogeneticists

- (ACC). 2005. Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment. *Lancet* 366: 123–128.
3. Cirigliano V, Voglino G, Ordoñez E, et al. 2009. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. *Prenat Diagn* 29(1): 40–49.
 4. Leung WC, Lau ET, Lao TT, Tang MH. 2004. Rapid aneuploidy screening (FISH or QF-PCR): the changing scene in prenatal diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 4(3): 333–337.
 5. Mansfield ES. 1993. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet* 2: 43–50.
 6. Hills A, Donaghue C, Waters J, Waters K, Sullivan C, Kulkarni A, Docherty Z, Mann K, Ogilvie CM. QF-PCR as a stand-alone test for prenatal samples: the first 2 years' experience in the London region. *Prenat Diagn*. 2010 Jun;30(6):509-17.
 7. T. Stojilkovic-Mikic, K. Mann, Z. Docherty and C. Mackie Ogilvie. Maternal cell contamination of prenatal samples assessed by QF-PCR genotyping, *Prenat Diagn* 25 (2005), pp. 79–83.

