View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Via Medica Journals

Analiza efektywności techniki MLPA w inwazyjnej diagnostyce prenatalnej najczęstszych aneuploidii

Effectiveness of multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) in prenatal diagnosis of common aneuploidies

Anna Jóźwiak[1], Julia Bijok[2], Diana Massalska[2], Barbara Pawłowska[1], Alicja Ilnicka[1], Joanna Bogdanowicz[1], Katarzyna Masternak-Wasiuk[1], Grzegorz Jakiel[2], Tomasz Roszkowski[2]

[1] Zakład Genetyki Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie, Polska
[2] I Klinika Ginekologii i Położnictwa – CMKP SPSK im. Prof. Orłowskiego w Warszawie, Polska

Streszczenie

Cel badania: *Ustalenie efektywności metody MLPA (multiplex ligation dependent probe amplification) w prenatalnej diagnostyce najczęściej występujących aneuploidii (chromosomów 21, 18, 13, X oraz Y) oraz porównanie wyników uzyskanych tą metodą z wynikami rutynowych technik prążkowych.*

Materiał i metoda: *Przeprowadzono badanie metodą MLPA z zastosowaniem zestawu sond SALSA MLPA P095 (MRC – Holland) na 195 próbkach DNA wyizolowanego z materiału pochodzącego z inwazyjnych badań prenatalnych wykonanych w Pracowni USG SPSK im. Prof. Orłowskiego od października 2008 r. do lipca 2012 r. u pacjentek o podwyższonym ryzyku aberracji chromosomowych u płodu oraz 5 próbkach materiału po poronieniu indukowanym. Jednocześnie prowadzono hodowle komórkowe i oceniano kariotyp klasyczną metodą cytogenetyczną.*

Wyniki: *Kariotyp oznaczono w 192 badaniach prenatalnych (98,5%; 192/195). W 52 przypadkach (26,8%) stwierdzono nieprawidłowy kariotyp płodu – w większości proste aneuploidie chromosomów 13, 18, 21, X i Y (86,5%, 45/52). Wynik metodą MLPA udało się uzyskać w 180 próbkach DNA z materiału pobranego prenatalnie (92,3 180/195). Bezwzględna czułość i swoistość metody MLPA wyniosła 100%. W dziewięciu próbkach pobranych prenatalnie metodą MLPA nie zidentyfikowano aberracji wykrytych klasyczną metodą prążkową lub FISH. W żadnym z tych przypadków nie było możliwe uzyskanie rzeczywistego wyniku stosowanym zestawem sond. We wszystkich próbkach materiału po poronieniu udało się przeprowadzić reakcję MLPA.*

Wnioski: *MLPA jest skuteczną metodą wykrywania najczęstszych aneuploidii w diagnostyce prenatalnej. Ze względu na małą ilość przeprowadzonych reakcji na materiale po poronieniu, ocena przydatności metody w tych przypadkach wymaga dalszych badań.*

Słowa kluczowe: **inwazyjna diagnostyka prenatalna / MLPA – multiplex ligation dependent probe amplification / szybkie metody molekularne / / kariotyp / aneuploidie /**

Adres do korespondencji:
Julia Bijok
I Klinika Ginekologii i Położnictwa – CMKP SPSK im. Prof. Orłowskiego w Warszawie
ul. Czerniakowska 231, 00-416 Warszawa, Polska
e-mail: julia.bijok@gmail.com

Otrzymano: **05.11.2012**
Zaakceptowano do druku: **10.06.2013**

© Polskie Towarzystwo Ginekologiczne

Abstract

Objectives: *To assess the effectiveness of the MLPA method (multiplex ligation dependent probe amplification) in prenatal diagnosis of common aneuploidies and compare its concordance with traditional karyotyping.*

Material and methods: *From October 2008 until July 2012 we performed 195 MLPA (MRC -Holland) tests with the P095 probe mix on DNA extracted from chorionic villi or amniotic fluid from pregnant women with elevated risk for abnormal fetal karyotype and 5 tests on miscarriage DNA samples. Cell culture and traditional karyotyping were performed in parallel.*

Results: *Traditional karyotyping was successfully performed in 192 cases (98.5%; 192/195). In 52 cases the fetal karyotype was abnormal (26.8%). The most common findings included aneuploidies of the following chromosomes: 13, 18, 21, X, Y (86.5%, 45/52). There were 179 conclusive and 1 inconclusive MLPA result (92.3%; 180/195). The absolute specificity and sensitivity of the MLPA test were 100%. In 9 cases traditional karyotyping revealed aberrations impossible to detect with the MLPA P095 kit. The MLPA reaction was successfully performed on all miscarriage DNA samples.*

Conclusions: *MLPA is an effective method for detecting common aneuploidies. Its effectiveness for miscarriage DNA samples remains to be elucidated in further studies.*

Key words: **invasive prenatal tests** / **MLPA** / **multiplex ligation dependent probe amplification** / **rapid molecular methods** / **karyotype** / **aneuploidies** /

Wprowadzenie

Zapoczątkowana w latach 60. inwazyjna diagnostyka prenatalna polega na pobraniu materiału płodowego – amniocytów, komórek trofoblastu albo leukocytów krwi pępowinowej, przede wszystkim celem analizy materiału genetycznego płodu pod kątem nieprawidłowości genetycznych. Najczęściej w pobranym materiale wykonuje się badanie cytogenetyczne w celu oznaczenia kariotypu płodu.

Badanie to niesie za sobą potrzebę założenia hodowli komórkowej trwającej 10 – 14 dni. Długi czas oczekiwania na wynik badania ma szczególne znaczenie w przypadku stwierdzenia nieprawidłowości anatomicznych płodu, które wiążą się z wysokim ryzykiem aberracji chromosomowych, a także w przypadku późno wykonywanych badań inwazyjnych. W razie potwierdzenia u płodu zaburzeń genetycznych, wczesna diagnoza pozwala na rozważne podjęcie decyzji dotyczących dalszego prowadzenia ciąży na wcześniejszym jej etapie. Jest to korzystne dla pacjentki ze względów zarówno psychologicznych, jak i medycznych.

Najczęściej wykrywanymi w badaniach prenatalnych aberracjami chromosomowymi są aneuploidie chromosomów 21, 18, 13, X, Y, które stanowią 60 do 85% wszystkich aberracji [1, 2]. W związku z tym do diagnostyki prenatalnej wprowadzono metody szybkiej diagnostyki tych aberracji bez konieczności wykonywania hodowli komórkowej. Początkowo stosowano technikę FISH do jąder interfazowych [3], następnie półilościową metodę QF-PCR [4], a w 2002 roku wprowadzono multipleksową amplifikację zależną od ligacji *(multiplex ligation dependent probe amplification* – MLPA) [5]. Obecnie jest to najczęściej stosowana w diagnostyce prenatalnej metoda szybkiego wykrywania wspomnianych wyżej aneuploidii, bez konieczności zakładania hodowli komórkowej [6, 7]. Wynik badania dostępny jest w ciągu kilku dni od pobrania materiału.

Metoda MLPA pozwala na ilościową ocenę do 50 różnych sekwencji DNA w trakcie jednej reakcji. Równocześnie można analizować 96 próbek z użyciem niewielkiej ilości DNA. W porównaniu z badaniem FISH lub klasyczną analizą prążkową chromosomów metoda jest stosunkowo tania. Z tego względu w wielu krajach została wprowadzona do rutynowej diagnostyki genetycznej, celem szybkiego wykluczenia najczęstszych aneuploidii [6, 7].

Pracownia USG I Kliniki Położnictwa i Ginekologii – CMKP jest ośrodkiem referencyjnym w zakresie diagnostyki prenatalnej. Rocznie wykonuje się w niej ok. 600 badań inwazyjnych. Pobrany materiał oceniany jest we współpracującym Zakładzie Genetyki Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie. W 2011 r. odsetek wykrytych nieprawidłowych kariotypów wyniósł ogółem 12% (biopsja kosmówki – 22%; amniopunkcja – 7,7%; kordocenteza – 14%). Podobnie jak w danych z piśmiennictwa ponad 85% stanowiły proste aneuploidie chromosomów 13, 18, 21, X i Y [1, 2]. W związku z tym wydaje się zasadne wprowadzenie szybkich metod wykluczających najczęstsze aberracje chromosomowe [8].

Cel pracy

Celem pracy było ustalenie efektywności metody MLPA w diagnostyce prenatalnej najczęściej występujących aneuploidii (chromosomów 21, 18, 13, X i Y) oraz porównanie wyników uzyskanych tą metodą z wynikami otrzymanymi rutynowymi technikami prążkowymi.

Materiał i metoda

Badana grupa

Prezentowane przez nas wyniki stanowią wstępne doniesienie na temat skuteczności nowo wdrażanej metody. Z tego względu nie określono ściśle kryteriów kwalifikacji próbek do oceny metodą MLPA.

© Polskie Towarzystwo Ginekologiczne

Badanie techniką MLPA przeprowadzano na DNA wyizolowanym z materiału pochodzącego z inwazyjnych badań prenatalnych wykonanych w Pracowni USG SPSK im. Prof. Orłowskiego: płyn owodniowy – 103 (51,5%), trofoblast – 92 (46%). Z tego materiału równolegle zakładano hodowlę komórkową i wykonywano preparaty do oceny kariotypu rutynowymi metodami prążkowymi.

Wskazania do badania inwazyjnego przedstawiono w tabeli I i tabeli II. Średni wiek ciąży w momencie badania inwazyjnego wynosił 15,4 t.c. (95% CI 14,9–15,9 t.c.), średni wiek pacjentek wynosił 33,2 lata (95% CI 32,3–34 lat).

Wszystkie badania inwazyjne wykonane były przez doświadczonego lekarza drogą przezbrzuszną w asyście ultrasonograficznej. Po odkażeniu miejsca wkłucia aspirowano 10–12 ml płynu owodniowego do pustej probówki lub fragment kosmówki do probówki z solą fizjologiczną z heparyną, które następnie przekazywano do Zakładu Genetyki Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie celem analizy DNA i oznaczenia kariotypu. Po pobraniu materiału sprawdzano czynność serca płodu.

Pięć próbek DNA (2,5%) pochodziło z ciąży obumarłej. Po indukcji poronienia fragment kosmówki lub skóry płodu pobierano do jałowego pojemnika z solą fizjologiczną. Materiał ten nie był poddany hodowli ani badaniu cytogenetycznemu. Wyniki badania metodą MLPA tych próbek zostaną omówione oddzielnie.

Metoda MLPA

Od października 2008 r. do lipca 2012 r. w Zakładzie Genetyki Psychiatrii i Neurologii wykonano 200 badań metodą MLPA z zastosowaniem zestawu sond SALSA MLPA P095 (MRC -Holland). Zestaw zawiera 36 sond: po 8 dla chromosomów 13, 18, 21, X oraz 4 dla chromosomu Y. W zestawie zawarte są również sondy kontrolne, które umożliwiają ocenę ilości DNA oraz efektywność denaturacji.

Cała reakcja MLPA prowadzona jest w jednej probówce. Sondy MLPA składają się z dwóch oligonukleotydowych sekwencji, z których każda zawiera sekwencje komplementarne do badanego DNA oraz do starterów.

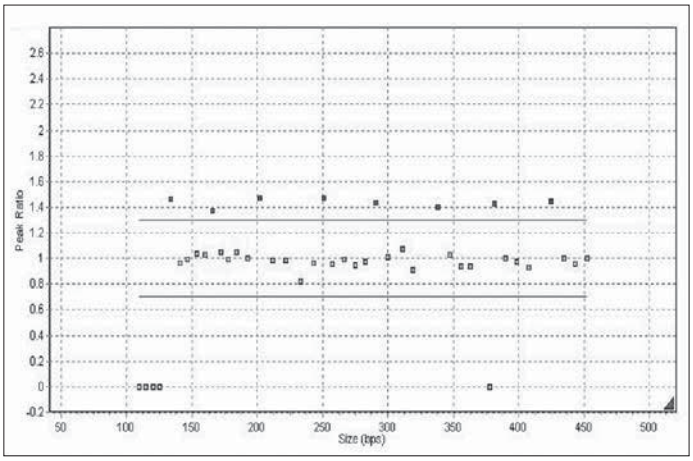
Po wstępnej denaturacji DNA, następuje hybrydyzacja sond komplementarnych do badanych sekwencji. Sąsiadujące ze sobą sondy ulegają połączeniu (ligacji), co umożliwia ich amplifikację w reakcji PCR. Znamienne dla MLPA jest to, że amplifikacji ulegają zhybrydyzowane i zligowane sondy, a nie badane DNA oraz fakt, że stosowane są jednakowe startery dla wszystkich sond w reakcji. Jeden z nich jest znakowany fluorescencyjnie [9].

Produkty reakcji są poddawane rozdziałowi za pomocą elektroforezy kapilarnej. Wyniki są analizowane w oparciu o ilościową ocenę długości i intensywności fluorescencji produktów PCR [5].

DNA z pobranego materiału izolowano metodą kolumienkową (QIAmap DNA Mini Kit – QIAGEN, Sherlock AX – AAbiotech) oraz metodą fenolową (część komórek trofoblastów).

Rozdział produktów reakcji MLPA przeprowadzano na aparacie firmy Applied Biosystems 3130 Genetic Analyser. Do analizy używano 0,7 µl produktu PCR. Otrzymane wyniki analizowano, porównując wysokość pików w badanych próbkach i w próbkach kontrolnych przy użyciu programu komputerowego GeneMarker V 1,97 (SoftGenetics LLC).

Prawidłowy stosunek wysokości danego piku uzyskanego dla badanej próby oraz piku dla próby kontrolnej wynosi 1+/-0,3. Wynik powyżej wartości 1,3 oznacza duplikację natomiast poniżej 0,7 wskazuje na delecję [10]. Przykładowy wynik MLPA przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Wynik MLPA z programu GeneMarker V 1,97 wskazujący na trisomię chromosomu 21 (kwadraciki poza zakresem prawidłowym).

Hodowla komórkowa i barwienie preparatów:

Hodowle komórkowe prowadzono w inkubatorze w temperaturze 37°C i w obecności 5%CO_2. Amniocyty hodowano na pożywkach kompletnych AmnioMax (Cytogen) i AmnioGrow (Gibco), natomiast do hodowli komórek trofoblastu stosowano tylko AmnioMax (Gibco). Średnio po 14 dniach do hodowli dodawano kolcemid w stężeniu 10 µg/ml i inkubowano przez 1,5 godziny. Następnie komórki zbierano, wirowano, poddawano szokowi hipotonicznemu w 0,075 M roztworze KCl przez około 30 minut i utrwalano mieszaniną metanolu i lodowatego kwasu octowego (3:1). Z tak uzyskanej zawiesiny komórkowej wykonywano preparaty na szkiełku mikroskopowym. Przygotowane preparaty trawiono trypsyną, a następnie barwiono odczynnikiem Giemzy (tzw. technika GTG). W razie potrzeby chromosomy barwiono również metodą prążkową CBG lub NOR, jak również stosowano technikę FISH. Standardowo analizowano ok. 20 płytek metafazowych z co najmniej dwóch naczyń hodowlanych.

Analiza statystyczna

Zebrane dane poddano analizie statystycznej za pomocą programu STATA 12. Przedstawiono statystykę opisową podając 95% przedział ufności (95% CI). Do oceny związku między danymi kategorycznymi użyto testu Chi^2, między danymi ciągłymi – testu t- Studenta. Za istotną przyjęto wartość statystyki testowej $<0,05$.

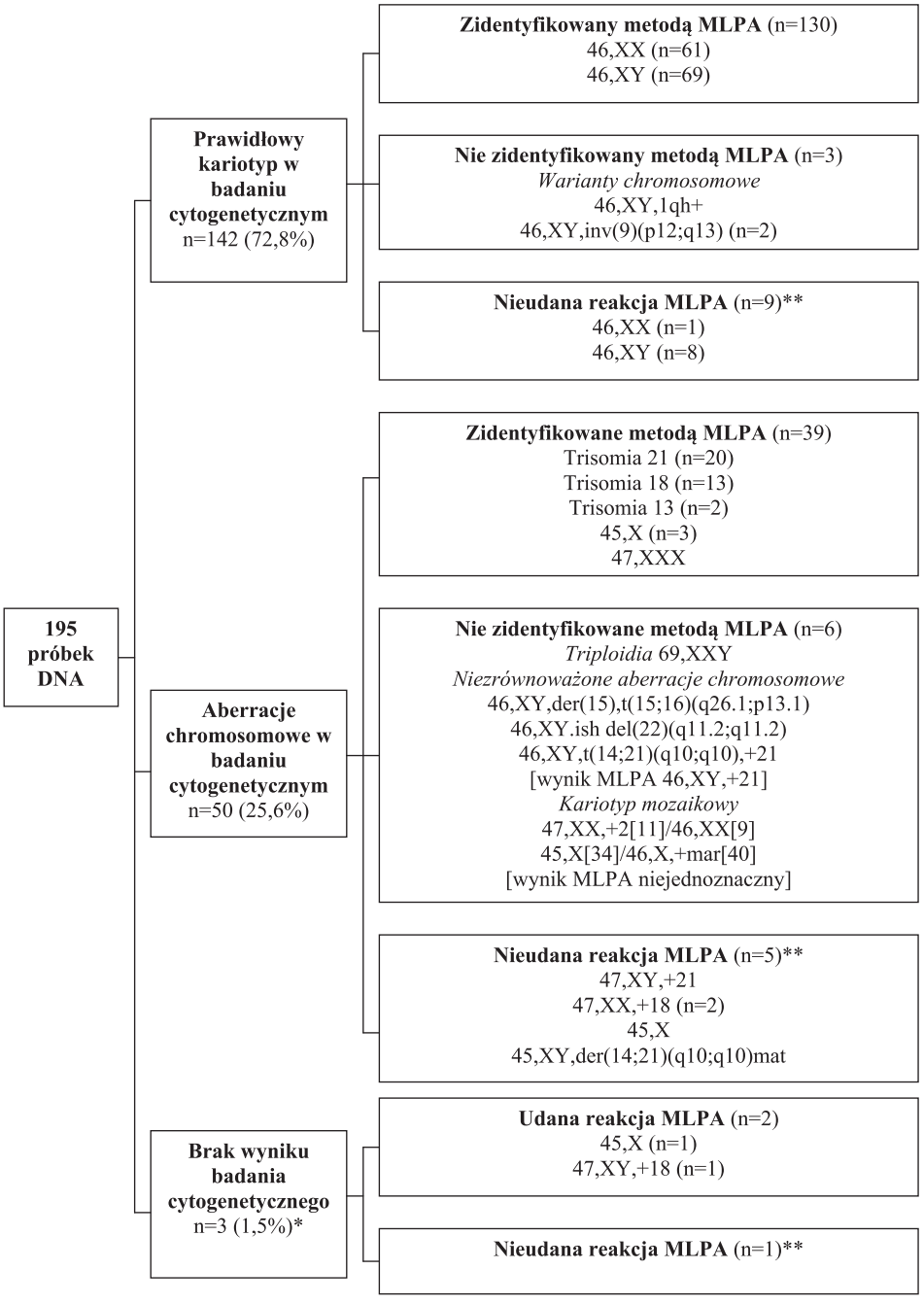
Wyniki

Na schemacie przedstawiono zestawienie wyników badania cytogenetycznego i MLPA.

Pełen kariotyp klasyczną metodą prążkową (GTG) oznaczono w 192 próbkach pobranych prenatalnie (98,5%; 192/195). W trzech przypadkach (trofoblast n=1, płyn owodniowy n=2) badanie cytogenetyczne nie było możliwe z powodu braku wzrostu komórek w hodowli, ale w dwóch z nich uzyskano wiarygodny

© Polskie Towarzystwo Ginekologiczne

Schemat: Wyniki badania cytogenetycznego i MLPA próbek pochodzących z badań inwazyjnych.



* brak wzrostu komórek w hodowli. ** zbyt mało lub złej jakości materiał genetyczny.

wynik metodą MLPA [mlpaX(P095)x1,13,18,21(P095)x2; mlpaX,Y(P095)x1,18(P095)x3,13,21(P095)x2].

Nieprawidłowy kariotyp płodu stwierdzono w 52 próbkach pobranych prenatalnie (26,8%). (Tabela III).

W dwóch próbkach wynik uzyskano tylko metodą MLPA. W większości (86,5%; 45/52) były to proste aneuploidie chromosomów 21, 18,13, X i Y, możliwe do wykrycia stosowanym zestawem sond MLPA (P095). Najwyższy odsetek nieprawidłowych kariotypów stwierdzono u płodów, poddanych badaniu ze względu na nieprawidłowy obraz USG (88,5%; 46/52). (Tabela I).

W tabeli II przedstawiono występowanie nieprawidłowości w USG. Jedynie dla zwiększonej przezierności karku, wodniaka karku i obrzęku uogólnionego płodu wykazano istotny statystycznie związek z występowaniem aberracji chromosomowych.

W 75 przypadkach wskazaniem do badania inwazyjnego była zwiększona przezierność karku u płodu. U płodów z nieprawidłowym kariotypem przezierność karku była istotnie wyższa, niż u pozostałych płodów [6,7mm, 95%CI 5,6 – 7,7mm vs 3,9mm, 95%CI 3,4-4,3mm; p<0,001].

© Polskie Towarzystwo Ginekologiczne

Tabela I. Wskazania do prenatalnego badania inwazyjnego

Wskazanie	n [%]	Badanie	Aberracje chromosomowe [%]
Nieprawidłowy obraz USG płodu • NT (średnie NT=5,2 mm; 95% CI 4,6 – 5,9 mm) • marker trisomii** • wada płodu	127 [65,2%] 75* 27* 39*	CVS [n=72] AC [n=55]	n=46 [88,5%] trisomia 21 (n=22)*** trisomia 18 (n=13) trisomia 13 (n=2) 45,X (n=5) 69,XXY 47,XXX 46,XY,der(15),t(15;16)(q26.1;p13.1) 46,XY.ish del(22)(q11.2;q11.2)
Wiek > 35 r.ż.	42 [21,5%]	CVS [n=11] AC [n=31]	n=1 [2%] 45,X[34]/46,X,+mar[40]
Aberracje chromosomowe w wywiadzie	12 [6,2%]	CVS [n=4] AC [n=8]	n=1 [2%] 47,XY,+18
Diagnostyka choroby monogenowej	4 [2%]	CVS [n=1] AC [n=3]	n=0 [0%]
Inne	10 [5,1%]	CVS [n=4] AC [n=4]	n=4 [7,7%] 47,XX,+18 (n=2) 47,XX,+2[11]/46,XX[9] 45,XY,der(14;21)(q10;q10)mat
Ogółem	**195 [100%]**	**CVS [n=92] AC [n=103]**	**n=52 [100%]****

* możliwe współwystępowanie wskazań; ** marker trisomii – brak kości nosowej, niedomykalność zastawki trójdzielnej, wsteczna fala A w przewodzie żylnym, jelito hiperechogenne; CVS – biopsja trofoblastu; AC – amniopunkcja;
*** [46,XY,t(14;21)(q10;q10),+21] zaliczony do grupy trisomii 21.**** w dwóch przypadkach wynik tylko na podstawie badania MLPA.

Wykazano istotnie statystycznie częstsze występowanie aberracji chromosomowych w materiale pochodzącym z biopsji trofoblastu, niż amniopunkcji [39,1%, n=36 vs 15,7%, n=16; p<0,001].

Ogółem w 180 przypadkach z materiału pobranego prenatalnie udało się uzyskać wynik metodą MLPA (92,3%, 180/195). Skuteczność metody była wyższa w przypadku DNA izolowanego z trofoblastu (95,7%; 88/92), niż z płynu owodniowego (88,4%; 91/103). Różnica ta była bliska istotności statystycznej (p=0,064).

W 15 przypadkach z powodu małej ilości materiału lub złej jakości DNA nie udało się uzyskać wiarygodnego wyniku metodą MLPA, ale w dwóch z tych przypadków prawidłowo określono płeć płodu. Wśród 15 nieudanych badań techniką MLPA znalazły się 4 przypadki aneuploidii możliwe do wykrycia stosowanym zestawem sond (45,X n=1; 47,XX,+18 n=2; 47,XY,+21 n=1). (Tabela IV).

W próbkach, dla których uzyskano wiarygodny wynik metodą MLPA, nie została pominięta żadna z 39 niemozaikowych niezrównoważonych aberracji chromosomów 13, 18, 21, X i Y. Nie odnotowano również wyników fałszywie dodatnich. We wszystkich przypadkach prawidłowo określono płeć płodu. Bezwzględna czułość i swoistość metody wyniosła 100%.

W dziewięciu przypadkach metodą prążkową stwierdzono aberracje chromosomowe niemożliwe do zidentyfikowania stosowanym zestawem sond MLPA. W trzech przypadkach były to warianty chromosomowe bez znaczenia klinicznego, w sześciu niezrównoważone rearanżacje chromosomowe. (Tabela V i Dyskusja). Względna czułość metody wyniosła 86,7%.

We wszystkich pięciu próbkach DNA, pochodzących z materiału po poronieniu uzyskano wiarygodny wynik metodą MLPA (100%; 5/5). Wyniki przedstawiono w tabeli VI.

Tabela II. Nieprawidłowy obraz USG płodu.

Nieprawidłowy obraz USG płodu	n*	Aberracje chromosomowe [%]
Zwiększona przezierność karku	75	36 [48%]**
Marker trisomii***	27	6 [22,2%]
Wada płodu	39	13 [33,3%]
• ośrodkowy układ nerwowy	9	2 [22%]
• serce	10	5 [50%]
• układ moczowy	6	1 [16,7%]
• omphalocoele, gastroschisis	13	6 [46,2%]
• układ kostny	3	1 [33,3%]
• inne wady	10	3 [30%]
• zespół wad	7	2 [28,6%]
• uogólniony obrzęk płodu	7	5 [71,4%]**
• wodniak karku	5	4 [80%]**
Ogółem	**127**	**46 [36,2%]**

* możliwe nakładanie się nieprawidłowości; ** istotne statystycznie (p<0,05);
*** marker trisomii – brak kości nosowej, niedomykalność zastawki trójdzielnej, wsteczna fala A w przewodzie żylnym, jelito hiperechogenne

© Polskie Towarzystwo Ginekologiczne

Tabela III. Nieprawidłowe kariotypy w badaniach prenatalnych.

Kariotyp	n	Materiał	Wiek	Wskazanie	MLPA
45,X	5	trofoblast (n=3) płyn (n=2)	30	USG (n=5)	mlpaX(P095)x1,13,18,21(P095)x2
47,XX,+13	1	trofoblast	26	USG (n=1)	mlpaX(P095)x2,13(P095)x3,18,21(P095)x2
47,XX,+18	8	trofoblast (n=6) płyn (n=2)	34	USG (n=6) inne (n=2)	mlpaX(P095)x2,18(P095)x3,13,21(P095)x2
47,XX,+21	9	trofoblast (n=6) płyn (n=3)	34	USG (n=9)	mlpaX(P095)x2,13,18(P095)x2,21(P095)x3
47,XY,+13	1	trofoblast	36	USG (n=1)	mlpaX,Y(P095)x1,13(P095)x3,18,21(P095)x2
47,XY,+18	8	trofoblast (n=6) płyn (n=2)	35	USG (n=7) wywiad (n=1)	mlpaX,Y(P095)x1,18(P095)x3,13,21(P095)x2
47,XY,+21	12	trofoblast (n=10) płyn (n=2)	36	USG (n=12)	mlpaX,Y(P095)x1,13,18(P095)x2,21(P095)x3
47,XXX	1	płyn	36	USG	mlpaX(P095)x3,13,18,21(P095)x2
69,XXY	1	płyn	31	USG	mlpaX,Y(P095)x1,13,18,21(P095)x2
45,XY,der(14;21)(q10;q10)mat	1	płyn	36	translokacja	brak wyniku
46,XY,t(14;21)(q10;q10),+21	1	trofoblast	27	USG	mlpaX,Y(P095)x1,13,18(P095)x2,21(P095)x3
46,XY.ish del(22)(q11.2;q11.2)	1	trofoblast	29	USG	mlpaX,Y(P095)x1,13,18,21(P095)x2
47,XX,+2[11]/46,XX[9]	1	trofoblast	37	inne	mlpaX(P095)x2,13,18,21(P095)x2
45,X[34]/46,X,+mar[40]	1	płyn	37	wiek	wynik niejednoznaczny
46,XY,der(15),t(15;16)(q26.1;p13.1)	1	trofoblast	32	USG	mlpaX,Y(P095)x1,13,18,21(P095)x2
Ogółem	**52**	**trofoblast (n=36) płyn (n=16)**	**34**	**USG (n=46) wiek (n=1) wywiad (n=1) inne (n=4)**	

Tabela IV: Przypadki, w których nie udało się uzyskać wyniku MLPA.

Kariotyp	Wskazanie	Materiał	n
46,XX	wiek	trofoblast	1
46,XY	USG (n=1) wiek (n=4) wywiad (n=3)	trofoblast (n=1) płyn (n=7)	8*
45,X	USG (wodniak karku, NT 14 mm)	płyn	1
47,XX,+18	USG (n=2)	trofoblast (n=2)	2
47,XY,+21	USG (wodniak karku)	płyn	1
45,XY,der(14;21)(q10;q10)mat	wiek, translokacja w rodzinie	płyn	1
brak wyniku	wiek	płyn	1
Ogółem		trofoblast (n=4) płyn (n=11)	15

* w dwóch przypadkach w MLPA udało się zidentyfikować płeć płodu [mlpaX,Y(P095)x1].

© Polskie Towarzystwo Ginekologiczne

Tabela V. Aberracje niezidentyfikowane metodą MLPA.

Kariotyp	Wskazanie	Materiał	MLPA
46,XY,1qh+*	USG (NT 5,6 mm)	trofoblast	mlpaX,Y(P095)x1,13,18,21(P095)x2
46,XY,inv(9)(p12;q13)*	USG (niedomykalność zast. trójdzielnej; pęcherz moczowy 14 mm)	trofoblast	mlpaX,Y(P095)x1,13,18,21(P095)x2
46,XY,inv(9)(p12;q13)*	USG (NT 3,5 mm)	płyn	mlpaX,Y(P095)x1,13,18,21(P095)x2
46,XY,der(15),t(15;16)(q26.1;p13.1)**	USG (obrzęk płodu, NT 8 mm), translokacja w rodzinie	trofoblast	mlpaX,Y(P095)x1,13,18,21(P095)x2
46,XY.ish del(22)(q11.2;q11.2)**	USG (NT 8 mm; podejrzenie wady serca)	trofoblast	mlpaX,Y(P095)x1,13,18,21(P095)x2
47,XX,+2[11]/46,XX[9]**	nieprawidłowy wynik testu Pappa	trofoblast	mlpaX(P095)x2,13,18,21(P095)x2
69,XXY**	USG (bezczaszkowie, łożysko – obraz sera szwajcarskiego)	płyn	mlpaX,Y(P095)x1,13,18,21(P095)x2
45,X[34]/46,X+mar[40]**	wiek	płyn	wynik niejednoznaczny
46,XY,t(14;21)(q10;q10),+21**	USG (NT 5,7 mm)	trofoblast	mlpaX,Y(P095)x1,13,18(P095)x2, 21(P095)x3
Ogółem	USG (n=7) wiek (n=1) inne (n=1)	trofoblast (n=6) płyn (n=3)	

* wariant chromosomowy, ** niezrównoważone aberracje chromosomowe

Dyskusja

Opisywana w literaturze, oparta na znacznie większym materiale, skuteczność metody MLPA wynosi w przypadku biopsji trofoblastu ok. 97%, natomiast amniopunkcji ok. 93% [7, 11, 12, 13]. Prezentowane przez nas wyniki wykazują nieco niższą skuteczność. Może to być wytłumaczone faktem wdrażania nowej metody i w związku z tym stosunkowo niewielkim doświadczeniem osoby prowadzącej reakcję. Większą efektywność metody w przypadku próbek uzyskanych poprzez biopsję trofoblastu, niż amniopunkcję, tłumaczy większa ilość DNA wyizolowanego z kosmków, co jest zgodne z aktualnym piśmiennictwem [11, 12]. Skuteczność MLPA była najwyższa w przypadkach materiału z poronienia (kosmki, skóra płodu), ze względu na dużą ilość łatwego do izolacji materiału genetycznego.

W naszym materiale uzyskano wysoki odsetek nieprawidłowych kariotypów [8], co związane jest z prawidłową kwalifikacją do badania inwazyjnego pacjentek o wysokim indywidualnym ryzyku aberracji chromosomowych u płodu. U pacjentek poddanych biopsji trofoblastu odsetek nieprawidłowych kariotypów był wyższy, niż u pacjentek poddanych amniopunkcji. Jest to spowodowane wykonaniem badania na wcześniejszym etapie ciąży, kiedy występuje większe ryzyko nieprawidłowego kariotypu u płodu. Część nieprawidłowych płodów ulega samoistnemu obumarciu i odsetek aberracji chromosomowych jest niższy w późniejszym etapie ciąży, kiedy przeprowadzana jest amniopunkcja [14]. Ponadto w naszym materiale u pacjentek poddanych biopsji trofoblastu częściej, niż w grupie poddanej amniopunkcji wskazaniem do badania był nieprawidłowy obraz USG, a w szczególności zwiększona przezierność karku płodu (≥3,5 mm), które związane są z dużym ryzykiem nieprawidłowego kariotypu [15].

W badanej grupie w dziewięciu próbkach oznaczanych metodą MLPA nie zidentyfikowano aberracji wykrytych metodą prążkową lub FISH. W siedmiu próbkach wynik MLPA nie wykazywał żadnych nieprawidłowości. Stosowany zestaw sond P095 przeznaczony jest do badania chromosomów 21, 18, 13, X i Y, natomiast niewykryte aberracje dotyczyły chromosomów 2, 15, 16, 22 lub wariantów chromosomowych (kariotypy zrównoważone). Z założenia nie było zatem możliwości wykrycia tych nieprawidłowości. W jednej próbce w MLPA stwierdzono trisomię 21 chromosomu [mlpaX,Y(P095)x1,13,18(P095)x2,21(P095)x3], natomiast w preparacie cytogenetycznym wykryto translokację robertsonowską [46,XY,t(14;21)(q10;q10),+21], czyli w efekcie trisomię 21. Stwierdzenie tej translokacji stanowi wskazanie do oznaczenia kariotypu u rodziców i może mieć znaczenie dla poradnictwa genetycznego badanej pary.

Wynik fałszywie ujemny nie miał znaczenia klinicznego w przypadku trzech próbek, w których metodą prążkową stwierdzono wariant chromosomowy, natomiast w czterech przypadkach metodą cytogenetyczną wykryto niezrównoważone aberracje, mogące mieć poważne implikacje kliniczne. Zostałyby one przeoczone, gdyby zastosowano jedynie metodę MLPA (2,2%; 4/179). W trzech z tych przypadków obraz USG wskazywał na bardzo wysokie ryzyko nieprawidłowego kariotypu. (Tabela IV). Wykrycie metodą prążkową wyżej wymienionych aberracji potwierdza zasadność wykonywania klasycznego badania cytogenetycznego, zwłaszcza w przypadku nieprawidłowości w badaniu USG i niewykrycia aneuploidii metodą MLPA.

Z powodu złej jakości DNA nie udało się przeprowadzić reakcji MLPA w 15 próbkach (7,7%) i wykryć czterech prostych aneuploidii (8,5% wszystkich prostych aneuploidii w badanej grupie).

© Polskie Towarzystwo Ginekologiczne

Do wyznaczenia względnej czułości metody obliczono stosunek wszystkich możliwych do wykrycia aberracji do wszystkich aberracji wykrytych klasyczną metodą prążkową. Wyłączono przypadki, w których nie udało się oznaczyć kariotypu metodą prążkową (n=3) oraz te, w których nie udało się przeprowadzić reakcji MLPA (n=15).

Jednym z ograniczeń MLPA jest brak możliwości wykrycia triploidii w przypadku płci żeńskiej, gdyż interpretacja wyników MLPA opiera się na porównaniu ilości materiału wykrytego przez poszczególne sondy. W przypadku zwiększenia ilości wszystkich chromosomów, ten stosunek ilościowy pozostanie niezmieniony. Według piśmiennictwa w niektórych przypadkach można zidentyfikować płeć męską [7, 16]. W badaniach MLPA wykonanych przez Diego – Alvarez i wsp. w 2011 r. nie udało się wykryć żadnej z czternastu triploidii obecnych w badanym materiale. Autorzy nie podają jednak płci w badanych próbkach [17, 18]. W naszym materiale występował jeden przypadek triploidii 69,XXY i również nie udało się go zidentyfikować przy pomocy MLPA [mlpaX,Y(P095)x1,13,18,21(P095)x2]. Poddany badaniu płyn owodniowy zawierał widoczną makroskopowo domieszkę krwi, co może tłumaczyć utrudnioną identyfikację triploidii XXY w związku z zanieczyszczeniem próbki komórkami matki (MCC *maternal cell contamination)* [7, 8].

Kwestia możliwości wykrycia metodą MLPA mozaikowatości, zarówno w badaniach postnatalnych jak i prenatalnych, nie została dotychczas jednoznacznie rozstrzygnięta. Z doniesień różnych autorów wynika, że wymagany poziom nieprawidłowej linii komórkowej możliwy do wykrycia z pomocą MLPA wynosi ok. 20%–30% [19, 20]. Niższy odsetek nieprawidłowej linii pozostaje zazwyczaj nie wykryty. Na wykrywalność mozaikowości ma również wpływ gęstość oraz liczba stosowanych sond, a także jakość badanego DNA. W naszym materiale nie udało się wykryć za pomocą MLPA żadnego z dwóch kariotypów mozaikowych.

W piśmiennictwie opisuje się przydatność techniki MLPA w określaniu pochodzenia chromosomu markerowego [21]. W naszym materiale w jednym przypadku na podstawie wyniku badania MLPA spodziewano się mozaikowego kariotypu z liniami komórkowymi: XYY/XY. Wskazywały na to podwyższone wartości pików pochodzących od chromosomu Y względem kontroli. W hodowli komórkowej uzyskano natomiast kariotyp mozaikowy: 45,X[34]/46,X,+mar[40]. Stwierdzono obecność linii komórkowej z monosomią chromosomu X oraz drugiej linii z jednym chromosomem X oraz chromosomem markerowym. Wynik badania MLPA pozwolił przypuszczać, że marker ten pochodzi z chromosomu Y. Badaniem FISH potwierdzono, że chromosom markerowy jest izochromosomem Y – i(Y)(pter-q11.2). Wskazaniem do wykonania badania był wiek pacjentki oraz nieprawidłowy wynik testu PAPPA. Rozbieżność uzyskanych wyników można tłumaczyć faktem, iż przy podanym udziale procentowym obydwu linii komórkowych nastąpiła kompensacja chromosomów płciowych z nieznaczną przewagą linii X i (Y) (pter-q11.2). W wyniku MLPA dwa piki odpowiadające chromosomowi Y były znacznie podwyższone względem kontroli, pozostałe dwa nieco mniej, jednak również odbiegały od normy. Można również przypuszczać, że procentowy udział linii komórkowych mógł być inny w komórkach, z których izolowano DNA oraz w hodowli komórkowej.

MLPA nie wymaga prowadzenia hodowli komórkowych ani wykonywania preparatów chromosomowych, dlatego może być przydatne w sytuacji, gdy nie udaje się uzyskać wzrostu komórek. Może to mieć miejsce w przypadku dużego obrzęku kosmków lub znacznego odsetka apoptotycznych amniocytów w płynie owodniowym (np. przy obrzęku płodu).

W naszej grupie w jednym przypadku pomimo dwukrotnie zakładanej hodowli amniocytów, nie udało się uzyskać wzrostu komórek (wskazanie – obrzęk płodu; NT=16 mm). Nie przeszkodziło to natomiast w prawidłowej izolacji DNA i przeprowadzeniu reakcji MLPA, w której wykryto monosomię X [mlpaX(P095) x1,13,18,21(P095)x2].

MLPA można stosować w celu wykrywania aberracji chromosomowych w materiale z indukcji poronienia [17]. W naszym badaniu wykazano wysoką skuteczność przeprowadzenia reakcji MLPA w pięciu próbkach DNA wyizolowanego z kosmówki lub fragmentu skóry płodu po poronieniu (100%). W dwóch z pięciu przypadków wykryto monosomię X. Należy jednak zaznaczyć, iż nie była w tych przypadkach zakładana hodowla komórkowa i niemożliwe było potwierdzenie wyniku klasyczną metodą cytogenetyczną. Jednakże, w dwóch przypadkach, w których stwierdzono monosomię X, można było poinformować pacjentki o prawdopodobnej przyczynie poronienia i ryzyku niepowodzenia w następnej ciąży. Stosowany zestaw sond służy do wykrywania najczęstszych aneuploidii (13, 18, 21, X, Y). Prawidłowy wynik MLPA oznacza zatem jedynie wykluczenie tych aberracji, a nie prawidłowy kariotyp płodu.

Przyczyną wczesnych poronień najczęściej są aberracje innych chromosomów (16, 22, 8, 9), więc do oceny materiału po poronieniu należałoby rozważyć stosowanie zestawu sond obejmującego strukturalne aberracje pozostałych chromosomów, a także regionów subtelomerowych (np. P036B, P070) [11, 14, 22, 23]. Ze względu na małą ilość przeprowadzonych przez nas analiz materiału po poronieniu indukowanym, ocena przydatności MLPA w tych przypadkach wymaga dalszych badań.

Główną zaletą metody MLPA jest krótki czas oczekiwania na wynik. W ciągu kilku dni można wykluczyć najczęstsze aberracje chromosomowe i uspokoić pacjentkę oczekującą na wynik badania cytogenetycznego.

Metoda ma bardzo wysoką czułość i swoistość w zakresie nieprawidłowości możliwych do wykrycia stosowanym zestawem sond. Jest również tańsza od innych szybkich metod, jak również od klasycznego oznaczania kariotypu metodą prążkową. Z tego względu w niektórych krajach proponuje się zastąpienie rutynowego badania cytogenetycznego przez MLPA [24]. Ponieważ jednak jest to metoda ukierunkowana jedynie na obecność konkretnych aberracji chromosomowych (w zależności od stosowanego zestawu sond), nie we wszystkich przypadkach można zrezygnować z wykonania badania cytogenetycznego. Prawdopodobnie znajduje to uzasadnienie w przypadku grupy niskiego ryzyka (np. pacjentek poddanych badaniu inwazyjnemu ze względu na wiek lub aberracje chromosomowe w wywiadzie) [7].

W przypadku pacjentek z grupy wysokiego ryzyka (w szczególności w przypadku nieprawidłowości w obrazie USG płodu), po wykluczeniu najczęstszych aneuploidii wskazane jest klasyczne oznaczenie kariotypu. Co ciekawe, w naszym materiale w grupie pacjentek, u których wskazaniem do badania inwazyjnego był wiek, jedyna zidentyfikowana aberracja była niemożliwa do wykrycia stosowanym zestawem sond (45,X[34]/46,X+mar[40]) (2%; 1/42).

© Polskie Towarzystwo Ginekologiczne

Należy podkreślić, że testy produkowane przez MRC - Holland nie mają atestów CE (ang. CE Mark) i nie mogą być używane do celów diagnostycznych. Nie przekreśla to MLPA jako wstępnego badania przesiewowego, jednak wymagane jest przeprowadzenie walidacji metody lub potwierdzenie uzyskanych wyników inną techniką diagnostyczną [6].

Wnioski

MLPA jest skuteczną i szybką metodą wykrywania najczęstszych aneuploidii (chromosomów 13,18, 21, X, Y).

Z dużym prawdopodobieństwem umożliwia stwierdzenie aneuploidii w materiale, z którego, z różnych względów, nie udało się otrzymać kariotypu, co może mieć istotne znaczenie w podejmowaniu decyzji dotyczących dalszego prowadzenia ciąży.

Metoda ta ma też swoje ograniczenia. Nie można nią wykryć zrównoważonych aberracji chromosomowych oraz niektórych przypadków mozaikowości i triploidii.

Ze względu na swoje ograniczenia metoda wymaga potwierdzenia uzyskanych wyników inną techniką diagnostyczną.

Ocena przydatności metody w przypadku materiału po poronieniu wymaga dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. Evans M, Henry G, Miller W, [et al.]. International, collaborative assessment of 146 000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent in-situ hybridization are used. *Human Reprod.* 1999, 14, 1213-1216.
2. Lewin P, Kleinfinger P, Bazin A, [et al.]. Defining the efficiency of fluorescence in situ hybridization on uncultured amniocytes on a retrospective cohort of 27 407 prenatal diagnoses. *Prenatal Diagnosis.* 2000, 20, 1-6.
3. Shaffer L, Bui T. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet.* 2007; 145, 87-89.
4. Mann K, Donaghue C, Fox S, [et al.]. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome anueploidy. *Eur J Hum Genet.* 2004, 12, 907-915.
5. Schouten J, McElgunn C, Waaijer R, [et al.]. Relative quantification of 40 nucleic acis sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002, 30, e57.
6. Faas B, Cirigliano V, Bui T. Rapid methods for targeted prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2011, 16, 81-87.
7. Kooper A, Faas B, Kater-Baats E, [et al.]. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) as a stand-alone test for rapid aneuploidy detection in amniotic fluid cells. *Prenat Diagn.* 2008, 28, 1004-1010.
8. Bocian E. Future of prenatal cytogenetic studies: rapid aneuploidy testing or full karyotype. *Ginekol Pol.* 2007,78, 881-887. Polish.
9. www.mlpa.com
10. Łaczmańska I, Łaczmański Ł. MLPA and its application in diagnosis of genetic diseases. *Post Biol Kom.* 2009, 36, 555-563.
11. Gerdes T, Kirchhoff M, Lind A, [et al.]. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in prenatal diagnosis-experience of a large series of rapid testing for aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn.* 2008, 28, 1119-1125.
12. Van Opstal D, Boter M, de Jong D, [et al.]. Rapid aneuploidy detection with multiplex ligation-dependent probe amplification: a prospective study of 4000 amniotic fluid samples. *Eur J Hum Genet.* 2009, 17, 112-121.
13. Bocian E, Kasprzycka J, Jakubów-Durska K, [et al.]. Usefulness of MLPA technique for rapid prenatal detection of aneuploidy. Results of 409 diagnostic studies. *Ginekol Pol.* 2011, 82, 680-684. Polish.
14. Snijders R, Sebire N, Nicolaides K. Maternal age and gestational age-specific risk for chromosomal defects. *Fetal Diagn Ther.* 1995, 10, 356-367.
15. Bijok J, Szyszka M, Michałowska A, [et al.]. Analiza biopsji trofoblastu przeprowadzonych w I Klinice Ginekologii i Położnictwa – CMKP SPSK im. Prof. Orłowskiego w Warszawie – doniesienie wstępne. *Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia. ,* 2010, 3, 145-152.
16. Gerdes T, Kirchoff M, Lind A, [et al.]. Computer-assisted prenatal aneuploidy screening for chromosome 13, 18, 21, X and Y based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Eur J Hum Genet.* 2005, 13, 171–175.
17. Diego-Alvarez D, Rodriguez de Alba M, Cardero-Merlo R, [et al.]. MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. *Prenat Diagn.* 2007, 27, 765-771.
18. Willis A, van den Veyver I, Eng Ch M. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2012, 32, 315-320.
19. Kooper A, Faas B, Feuth T, [et al.]. Detection of chromosome aneuploidies in chorionic villus sampling by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Mol Diagn.* 2009, 11, 17-24.
20. Boormans E, Birnie E, Oepkes D, [et al.]. Comparison of multiplex ligation-dependent probe amplification and karyotyping in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol.* 2010, 115, 297-303.
21. Van Opstal D, Boter M, Noomen P, [et al.]. Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) for rapid distinction between unique sequence positive and negative marker chromosomes in prenatal diagnosis. *Mol Cytogenet.* 2011, 4, 2.
22. Van den Berg M, van Maarle M, van Wely M, Goddijn M. Genetics of early miscarriage. *Biochim Biophys Acta.* 2012, 1822, 1951-1959.
23. Carvalho B, Dória S, Ramalho C, [et al.]. Aneuploidies detection in miscarriages and fetal deaths using multiplex ligation-dependent probe amplification: an alternative for speeding up results? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010, 153, 151-155.
24. Ogilvie C, Lashwood A, Chitty L, [et al.]. The future of prenatal diagnosis: rapid testing or full karyotype? An audit of chromosome abnormalities and pregnancy outcomes for women referred for Down syndrome testing. *BJOG.* 2005, 112, 1369–1375.

© Polskie Towarzystwo Ginekologiczne