

СТАНДАРТНО КАРИОТИПИРАНЕ – ПРОЧИТ НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРИЛОЖЕНИЕ

Мари Хачмериян, Мария Левкова, Милена Стоянова, Валентина Митева,
Людмила Ангелова

Лаборатория по медицинска генетика, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна

STANDARD KARYOTYPING – A LOOK THROUGH THE EUROPEAN GUIDELINES

Mari Hachmeriyan, Maria Levkova, Milena Stoyanova, Valentina Miteva,
Lyudmila Angelova

Laboratory of Medical Genetics, St. Marina University Hospital, Varna, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Стандартното кариотипиране е метод за оценка на хромозомни аберации при определени индикации. Въпреки наблюдавания напредък в сферата на молекулярно генетичните технологии, в развиващите се страни поради финансови и икономически фактори то остава масово прилаган анализ. През 2019 година са публикувани най-новите европейски препоръки при провеждането на цитогеномни анализи. Те включват общи и специфични насоки за работа с коментар по преаналитични мероприятия, обработка на проби, анализ и издаване на резултати. Обсъждат се и възможностите, ограниченията и минималните изисквания за издаване на резултат за всеки един от наличните лабораторни методи. Спазването на добри практики за провеждане на генетичен анализ и/или повторно установяване на контакт при пациенти с вероятна генетична диагноза е важно с цел осигуряване на максимално качествена медицинска услуга. Всяка лаборатория следва да прилага утвърдени протоколи, следвайки актуалните стандарти, възприети от водещи в сферата организации.

Ключови думи: стандартно кариотипиране, цитогеномика, ръководство, повторен контакт

ABSTRACT

Standard karyotyping is a method for genetic testing for chromosomal aberrations, based on specific clinical indications. Despite the progress in the field of molecular genetic testing, it still remains the first choice for genetic testing in developing countries due to financial and economic factors. In 2019, the latest European guidelines for constitutional cytogenomic analysis were released. They include general and specific guidelines for pre-analytical recommendation, sample preparation, analysis and reporting. Possibilities, limitations and minimum requirements for specific genetic testings are listed. Following the established European guidelines for genetic analysis and/or re-contacting patients with a possible genetic diagnosis will provide up-to-date medical service. Each laboratory should apply validated protocols for testing, based on the newly introduced recommendations by leading in the field organizations.

Keywords: standard karyotyping, cytogenomics, guidelines, re-contact

ВЪВЕДЕНИЕ

Технологичният напредък в сферата на медицинската генетика извежда молекулярно генетичните анализи като метод на първи избор за диагностициране на генетични състояния за сметка на традиционното стандартно кариотипиране. Въпреки това в развиващите се страни поради финансови и икономически фактори цитогенетичният анализ е все още масово прилаган. В България например кариотипирането остава един от основните генетични тестове, предлаган по разнообразни индикации. Честото използване на този метод в ежедневната практика налага необходимостта от своевременно актуализиране на работните протоколи и следване на актуалните стандарти, възприети от водещи в сферата европейски организации.

ИЗЛОЖЕНИЕ

В България съществува действащ стандарт по медицинска генетика, който включва националните изисквания и препоръки за поведение (Наредба №38 от 20.08.2010 г. за утвърждаване на медицински стандарт „Медицинска генетика“) (6). Извън този тип регулация всяка лаборатория следва да прилага свои утвърдени протоколи, като участва и в различни форми на външен и вътрешен контрол.

В Европа първите насоки за осигуряване на качествено цитогенетично изследване са публикувани през 2009 година, а впоследствие актуализирани през 2012 година (3). В отговор на нарастващото приложение на молекулярно генетични анализи, през 2019 година са публикувани най-новите европейски препоръки при провеждането на цитогеномни анализи (5).

Въведеният термин цитогеномика включва в себе си конвенционалните цитогенетични анализи с молекулярно цитогенетичните (флуоресцентна ин ситу хибридизация и микроарей) и молекулярно базирани техники за оценка на хромозомни аберации.

Публикуваните документи съдържат общи (преданалитични, основни и допълнителни клинични индикации за пре- и постнатална диагноза, подготовка на пробите, анализ и издаване на резултати) и специфични препоръки (кариотипиране, синдроми с хромозомна нестабилност, FISH, QF-PCR, MLPA и array CGH базирани анализи, секвениране от ново поколение за CNV и целоекзомно секвениране).

Включени са задължителни и препоръчителни насоки за работа.

Препоръките не включват изисквания спрямо оборудване и персонал. Те от своя страна, както и стандартните работни протоколи за пре- и постаналитични процедури, следва да са в съответствие с ISO15189 и/или ISO17025.

Общите насоки за работа включват преаналитични препоръки (в това число показания за цитогеномни изследвания), обработка на пробите, анализ и издаване на резултати.

При провеждане на медико-генетичната консултация за обсъждане на вероятно подлежаща цитогеномна патология следва:

1. да бъде попълнено информирано съгласие (вкл. копие за лабораторията в зависимост от националните стандарти);
2. предоставяне на пре- и постаналитична генетична консултация от лекар, медицинска сестра или лабораторен кадър, обучен в медико-генетичната сфера;
3. коментиране на същността, принципите, възможностите и ограниченията на предложения тест в конкретния случай;
4. възможността за случайна находка, непряко свързана с показанието за изследване, но с клинично значение, възможност за получаване на неинформативен или несигурен резултат;
5. осигуряване на медико-генетична консултация след получаване на резултат за обезпечаване възможността на пациента за напълно информирано решение.

Показания за насочване към цитогеномен анализ са представени в Табл. 1.

При избор на метод следва да се имат предвид възможностите и ограниченията на различните видове анализи, представени в Табл. 2.

ОБРАБОТКА НА ПРОБИТЕ

В зависимост от индикациите и вида на анализиранияте проби особеностите при обработка може да варира. Въпреки това общите правила са приложими.

Пренаталните проби следва да се работят в две серии или самостоятелно.

Що се отнася до пренаталния анализ, този на хориални вѐси след култивиране дава по-добра информация за феталния кариотип, сравнено с прекия анализ. Мезенхимните клетки са по-репрезентативни от цитотрофобласта за доказване на феталния кариотип. Необходимо е замразяване на витални клетки и/или фиксиран клетъчен пул, които могат да се използват за продължаване на анализа при необходимост.

Табл. 1. Показания за насочване към цитогеномен анализ

Основни индикации за пренатална диагноза	<ul style="list-style-type: none"> ◇ Патологично УЗ на фетус ◇ Повишен риск от скринингово изследване за хромозомна болест в плода ◇ Наличие на хромозомно преустройство, мозаицизъм при родителите ◇ Предходна бременност/мъртво раждане с хромозомна патология ◇ Възможен фетален мозаицизъм, открит от предходно изследване ◇ Фамилно моногенно заболяване
Основни индикации за постнатална диагноза	<ul style="list-style-type: none"> ◇ Патологичен клиничен фенотип; множествени вродени аномалии ◇ Клинично значимо отклонение в растежа – нисък ръст, свръхрастеж, микро- и макроцефалия ◇ Първична или вторична аменорея или овариална недостатъчност ◇ Двусмислени гениталии ◇ Неуточнен инфертилитет ◇ Азооспермия или тежка олигоспермия ◇ Живо или мъртво раждане на плод с неуточнен малформативен синдром ◇ Три и повече СПА след нормално зачеване ◇ Значима фамилна анамнеза за хромозомно преустройство ◇ Значима фамилна история за интелектуален дефицит с вероятна хромозомна етиология, когато не е възможно изследване на индексния пациент ◇ Носителство на X свързано рецесивно нарушение при жени
Други постнатални индикации	<ul style="list-style-type: none"> ◇ Изследване на родители на дете с разкрита пре- или постнатално хромозомна аберация ◇ Уточняване на патологичен цитогеномен резултат ◇ Рефракторна епилепсия за изключване на мозаицизъм

Табл. 2. Възможности и ограничения на различните видове анализи

Метод	Резолюция	Ограничения
Стандартно кариотипиране	5-10 Мб	Не откриват малки преустройства под посочената резолюция; мозаицизъм <10%, нуклеотидни варианти, унипарентална дизомия
Флуоресцентна ин ситу хибридизация	≈ 100 кб	Ограничен в зависимост от използваните сонди (таргетен анализ); Не открива мозаицизъм <10%, нуклеотидни варианти, унипарентална дизомия
Микрочипов анализ, SNP-базиран	≈ 20-200 кб	Не открива балансирани преустройства, мозаицизъм <10%, нуклеотидни варианти, произхода на структурната аберация, изолирани клетъчни линии, хетерохроматинови маркери, триплоидия (не важи за SNP-базиран арей), инипарентална дизомия (не важи за SNP-базиран арей)
CNV анализ при целоекзомно секвениране	100 бд (екзонен регион) ≈ 150 кб (в целия геном)	Не открива балансирани преустройства, мозаицизъм <18%, произхода на структурната аберация, изолирани клонове/ клетъчни линии

При провеждане на постнатален анализ поради потенциална нужда от препосвяване следва пробите кръв да се съхраняват до 5 дни.

При изолиране на ДНК трябва да се цели постигане на максимална автоматизация на процеса и минимален трансфер от епруветка в епруветка. Необходими са вътрешни критерии за минимално изискуемо количество и качество на използваната ДНК. С цел минимизиране на риска от контаминация при ДНК анализа е наложително разделянето на работните помещения на пре- и пост PCR зони, както и включването на

контроли във всеки рън. Акцентира се на коректното обозначаване на пробите.

За пренатални проби е необходима посявка и анализ в минимум две серии. Потвърдението на патологичен бърз тест за анеуплоидии изисква посявка само в една серия.

Възможността от майчина контаминация и плацентарен мозаицизъм трябва да се вземе под внимание при обработка на проби от хорионбиопсия или наличие на кръв в амниотичната течност. Препоръчва се майчината децидуа да бъде внимателно отстранена от хориалните въси за

последващ ДНК анализ или клетъчно култивиране. При съмнение за произхода на пренаталната проба следва да се проведе генотипиране. Препоръчва се анализ на хетерогенна клетъчна популация за минимизиране на противоречивите резултати.

АНАЛИЗ

Лабораториите следва да осигурят екип с умения и експертност, както и колаборация с други лаборатории в страната и чужбина и контрол на извършените анализи. Акцентира се на необходимостта от продължаващо обучение на членовете на екипа, следващ писмени критерии стандартни оперативни протоколи.

Анализът на пациентските проби трябва да се осъществява от квалифициран персонал. Резултатът трябва да бъде верифициран от втори член на екипа, като е препоръчително провеждането на „сляпа“ проверка.

ИЗДАВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИ

Резултатите следва да бъдат максимално недвусмислени, информативни и ясни дори и за неспециалисти, да включват заключение, интерпретация на резултата и отговор на клиничното запитване.

Желателно е да се избягват многословните резултати, както и акцентирание на методологията и ограниченията на изследването, тъй като това може да отклони вниманието от същината на резултата и интерпретацията му.

Издаването на резултат следва да бъде за максимално кратко време – използване на най-новите номенклатури (ISCN, HGVS, HGNC).

Промените в единични клетки не се препоръчва да се включват в резултата. При комплицирани резултати може да се използва таблично представяне.

Резултатът следва да съдържа (2,4,5):

- Показание за насочване/индикации за изследване;
- Дата на вземане на пробата, дата на получаване и дата на издаване на резултат;
- Идентификация на пациента – пълно име и дата на раждане; близнаците трябва да бъдат ясно различни;
- Пол на пациента (за постнатални анализи – значимо при заболявания, свързани с нарушения в половата диференциация);
- Уникален идентификатор на пробата;
- Насочващ лекар и болница;
- Лабораторна идентификация;

- Вид на изследваната тъкан;
- Ясно обобщение на резултата;
- Описателно пояснение на резултата, включващо пола на пациента (за пренатални резултати коментарът на пола е по избор);
- Описателна интерпретация на резултата (достатъчно ясна и за неспециалисти);
- Връзка на резултата с показанието и/или отговор на клиничното запитване;
- Описание на използвания кит/реактиви/платформа с коментар на ограниченията на теста;
- Идентификация на пациента на всяка страница от резултата;
- Имена и подпис (електронен или собственоръчно) на един или двама оторизирани лица;
- Ясно номериране на страниците (1 от 1, 1 от 2).

При патологични резултати е необходимо допълнително включване на:

- Ясно писмено пояснение на патологията;
- Връзка на клиничната картина с (последствие от) резултата;
- Необходимост от допълнителни изследвания за потвърждаване на резултата и/или предполагаемата диагноза, както и необходимия материал за препоръчания анализ;
- Оценка на риск за повторение, при необходимост;
- Пренатална диагностика за бъдещи бременности при необходимост;
- Препоръка за медико-генетична консултация;
- Необходимост от провеждане на изследване на други членове на семейството в риск, започвайки от най-близките;
- Референтни граници при издаване на патологичен резултат.

Наличието на майчина контаминация или псевдомозаицизъм следва да бъде отбелязано в лабораторните журналы, но да не се включва в крайния резултат, ако няма отношение към интерпретацията на резултата. Разкрит истински мозаицизъм или плацентарен мозаицизъм на проба от хорионбиопсия следва да се коментира в крайния резултат. Процентното разпределение при открит мозаицизъм в резултат от амниоцити може да не съответства на клетъчното разпределение във фетуса.

При необходимост от допълнително пре- и постнатално изследване това трябва винаги да бъде ясно отбелязано.

Специфичните насоки акцентират на по-задълбочени препоръки, касаещи конституционалните цитогеномни анализи, провеждани с наличните към момента техники.

Кариотипиране се извършва с G-оцветяваща техника, като лабораторията осигурява достигане на минимално изискуемата резолютивна възможност на използваната техника (Табл. 3).

при налична в литературата информация за съществуваща фенотипно-генотипна корелация. В противен случай откритата находка може да се интерпретира като нарушение с неясно значение. Полиморфни варианти без клинично значение трябва да бъдат отбелязвани само в лабораторния отчет, без коментар в крайния резултат, за да се изключи объркване от страна на неспе-

Табл. 3. Минимално изискуемата резолюция за издаване на резултат при съответното показание

Показание	Минимална резолюция за издаване на нормален резултат
Потвърждение на анеуплоидия	< 300 бд
Изключване на известна голяма структурна аберация	300 бд
Откриване/отхвърляне на малки очаквани структурни преустройства; рутинна пренатална обработка на проби	400 бд
Пренатална диагностика с показание патологичен резултат от УЗ изследване (при липса на микрочипова диагностика)	550 бд
Рутинна постнатална диагностика	550 бд

Когато не е възможно постигане на минимално изискуема резолюция и при липса на патология, не е оправдано изискването на повторение на инвазивна процедура.

Лабораторията трябва да следва писмени протоколи за провеждания от нея анализ. Непълни метафази не трябва да се включват в резултата. Метафазният анализ трябва да включва анализ на всяка двойка хромозоми, вкл. полови, бенд по бенд. При прекръстосване на някоя от хромозомите, тя трябва да бъде допълнително анализирана в друга метафаза (Табл. 4). Лабораториите могат да прилагат броене на по-голям брой клетки рутинно, за да изключат мозаицизъм. Лабораторните протоколи следва да включват броя на анализирани и броя на преброените метафази, заедно с допълнителна информация.

При клинично съмнение за наличие на мозаицизъм следва да се увеличи броят на анализирани метафази. Коментари за клиничната значимост на откритата патология може да се включат

специалисти. За такива се считат вариации в размера на хетерохроматиновите блокове, размерът на сателитите, периферичните инверсии (включващи хетеро или еукроматинови региони).

Мозаицизъм или псевдомозаицизъм следва да бъдат изключени от крайния резултат, ако е вероятно да бъдат артефакт от култивирането (след компетентна оценка). При наличен мозаицизъм XX/XУ >10% в пренаталните проби е необходимо провеждане на допълнителни анализи.

Допълнителната информация от предходното ръководство включва препоръки по отношение на минималния брой проби годишно за поддържане на компетенциите на екипа (500 проби независимо от типа). От всеки вид анализ минималният изискуем брой е 100 проби (3).

Извън представените параграфи, в цитирания документ се разглеждат и препоръките при цитогеномни анализи за синдроми с хромозомна нестабилност, анализ с флуоресцентна ин ситу хибридизация, QF-PCR, MLPA базирани техни-

Табл. 4. Анализ на минимум брой метафази в зависимост от вида на изследваната тъкан

Проба	Показание/резултат	Брой минимум анализирани метафази	Допълнителен брой метафази за броене
Пренатална	Рутинно	2 (от 2 серии)	0
Постнатална	Рутинно	2	0
Пре- и постнатална	За изключване на мозаицизъм или при открита аномалия в една клетка	2	28

ки, микрочипов анализ, секвениране от ново поколение за CNV, цялоекзомно секвениране.

Новите методи за генетичен анализ имат по-висока резолютивна възможност и биха могли за повишат диагностичния процент при пациенти с нормален резултат от стандартно кариотипиране. От друга страна, след приключване на анализа, в случаите, когато е налична нова информация за открити генетични варианти, е възможна промяна в интерпретацията на клиничната им значимост. Възникват етични въпроси – дали, кой и в кои ситуации има отговорност да осъществи повторен контакт с пациента. Комитетът за публична и професионална политика на Европейското общество на човешката генетика (ESHG), заедно с изследователски групи от Великобритания и Холандия са разработили препоръки относно повторно свързване (1). Те засягат например пациенти с неоткрита, но вероятна генетична диагноза и проведен единствен анализ с конвенционално кариотипиране.

Формулираните препоръки са изложени в тринадесет точки:

1. Ако е възможно, трябва да се извърши повторно свързване при налична доказана полза за пациента, въпреки че към момента няма задължение за това.
2. Решението за повторно установяване на контакт трябва да се основава на интересите на пациента/семейството.
3. Установяването на повторен контакт следва да бъде в съответствие със здравната система.
4. Осигуряването на специално предназначени ресурси за дейности за повторно свързване трябва да се обмислят.
5. Повторното свързване следва да е справедливо, включвайки пациенти от всички социално-икономически съсловия и независимо от показанията.
6. Необходим е професионален консенсус за добра практика по отношение на информираното съгласие за установяване на повторен контакт.
7. Установяването на повторен контакт трябва да бъде споделена отговорност с пациентите.
8. Установяването на повторен контакт трябва да бъде споделена отговорност с генетичните лаборатории.
9. Споделянето на данни следва да се насърчава.
10. Други заинтересовани страни също трябва да споделят отговорност за повторно установяване на контакт.
11. Да се направи всичко възможно с ограничени ресурси.
12. Всяка страна трябва да определи своя организационна политика по отношение на процеса на повторно установяване на контакт.
13. Необходимо е допълнително проучване на проблема за обезпечаване процеса на повторно установяване на контакт.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Специалността „Медицинска генетика“ е рядка и уникална по своята същност. В последните години се наблюдава бурно развитие на технологиите за геномен анализ, както и рязко увеличаване на научните открития, свързани с патогенезата на заболяванията на молекулно ниво. В тази връзка е наложително следването и прилагането на актуализирани стандарти, утвърдени от експертни групи в областта. Въпреки масовото приложение на молекулярно генетични анализи в областта на медицинската генетика по света, стандартното кариотипиране има своето място при специфични индикации. Важно е познаването на възможностите и ограниченията на всеки един от наличните лабораторни методи, както и спазването на добри практики за провеждане на генетичен анализ и/или повторно установяване на контакт, с цел осигуряване на максимално качествена медицинска услуга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carrieri D, Howard H, Benjamin C, Clarke A, Dheensa S, Doheny S. et all. Recontacting patients in clinical genetics services: recommendations of the European Society of Human Genetics. *European Journal of Human Genetics* (2019) 27:169–182 <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0285-1>
2. Claustres M, Kožich V, Dequeker E, et al. European Society of Human Genetics. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). *Eur J Hum Genet.* 2014; 22:160–70. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3895644/>
3. Hastings R, Howell R, Bricarelli FD, Kristoffersson U, Cavani S. A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations. *ECA Newsl.* 2012; 29:7–25. <https://www.e-c-a.eu/en/GUIDELINES.html>

4. Smith K, Martindale J, Wallis Y, Bown N, Leo N, Creswell L et al. Deans General Genetic Laboratory Reporting Recommendations http://www.acgs.uk.com/media/949852/acgs_general_genetic_laboratory_reporting_recommendations_2015.pdf
5. Silva M, Leeuw N, Mann K, Schuring-Blom H, Morgan S, Giardino D et al. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. Eur Jour of Hum Genetics 2019; 27:1-16 <https://www.nature.com/articles/s41431-018-0244-x>
6. http://www.mh.government.bg/media/filer_public/67/28/67287d1f-8901-42aa-8ca8-f75f681b999c/meditsinski-standart_meditsinska-genetika.pdf

Адрес за кореспонденция:
Мари Хачмериян
Лаборатория по медицинска генетика
УМБАЛ „Св. Марина“
бул. „Христо Смирненски“ 1
Варна 9010
e-mail: mari.hachmeriyan@gmail.com