

Veaceslav Moșin, Alina Hotineanu, Adrian Crețu, Rodica Certan-Bejan, Veaceslav Moșin jr.  
**METODE DE DIAGNOSTIC PRENATAL: QF-PCR, CARIOTIPUL, FISH, NIFTY**  
Centrul Medical „Repromed”

**SUMMARY**

---

**PRENATAL DIAGNOSTIC METHODS: QF-PCR, KARYOTYPING, FISH, NIFTY**

**Key words:** *karyotype; FISH; QF-PCR; NIFTY; ultrasound; prenatal diagnosis; prenatal screening; amniocentesis; infertility.*

*Contemporary cytogenetic and molecular genetic technologies offer a solid basis for an accurate and early diagnosis of genetic diseases. Because of the rapid progress in both areas prenatal diagnosis became an efficient instrument both for medical geneticists and gynecologists.*

*The development of complex techniques of prenatal molecular diagnosis has produced a real burst of information, which requires an appropriate interpretation and application by the clinician for the benefit of the patient.*

*Our purpose is to make a brief analysis of the classical and newest methods of prenatal genetic diagnosis and to evaluate risks and benefits of each method both for pregnant and fetus.*

**SUMMARY**

---

**МЕТОДЫ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ: QF-PCR, КАРИОТИП, FISH, NIFTY**

**Ключевые слова:** *кариотип; FISH; QF-PCR; NIFTY; УЗИ; пренатальная диагностика; пренатальный скрининг; амниоцентез; бесплодие.*

*Современная цитогенетика совместно с прогрессом молекулярно-генетических технологий проложили путь к более точному и значительно более раннему диагностированию генетических заболеваний, которые сделали пренатальную диагностику весьма эффективным инструментом для врача гинеколога и генетика.*

*Разработка более сложных молекулярных методов пренатальной диагностики привела к взрыву информации, которая должна быть применена врачами для блага пациентов. С помощью этой статьи мы хотим сделать краткий анализ классических и новейших методов для пренатальной диагностики генетических заболеваний, взвесить пользу и риск каждого метода, как для беременной, так и для плода.*

**Introducere.** Cele mai multe dintre femeile care se decid să facă diagnosticul prenatal o fac pentru a evita nașterea unui copil cu anomalii cromozomiale. Cromozomii sunt unități microscopice prezente în toate celulele corpului. Celulele somatice umane conțin fiecare câte 23 de perechi de cromozomi. Câștigarea sau pierderea de cromozomi în celulele umane va cauza malformații genetice fetale și perturbări ale dezvoltării embriofetale. Trisomia 21 (sindromul Down), 18 (sindromul Edwards) și 13 (sindromul Patau) sunt cele mai cunoscute trei anomalii cromozomiale, care sunt cauzate de prezența unui număr suplimentar al cromozomilor 21, 18, respectiv 13. Aneuploidiile cromozomilor sexuali se caracterizează prin adaosul sau pierderea unui cromozom X sau Y: monosomia X (sindromul Turner), XXY (sindromul Klinefelter), XXX (Triplu X), XYY [1].

Materialul genetic suplimentar poate provoca unele caracteristici dismorfice, defecte fizice grave pre-

zente încă de la naștere, malformații congenitale și handicap intelectual de diferite grade.

**Ecografia** este utilă în identificarea prenatală a aneuploidiilor, deoarece feții cu cariotip anormal au deseori modificări sau defecte structurale sugestive, vizibile ecografic. Markerii ecografici ai aneuploidiilor, evidențiabili în trimestrul I al sarcinii: - translucența nucală; - osul nazal (absența sau hipoplazia); - velocimetria ductului venos (absența sau inversarea fluxului pe ductul venos în timpul contracției atriale); - regurgitarea tricuspidiană (regurgitarea sângelui prin valva tricuspidiană). În trimestrul II al sarcinii, markerii ecografici ai aneuploidiilor pot fi: - anomalii cerebrale (ventriculomegalie, microcefalie); - anomalii ale cordului și ale vaselor mari; - anomalii urogenitale; - anomalii toracice; - anomalii ale membrelor; - anomalii digestive și ale peretelui abdominal [2,3].

**Diagnosticul prenatal prin amniocenteză.** Amniocenteza constă în extragerea unei cantități mici din lichidul amniotic care înconjoară fătul din uter. Proce-

dura se efectuează într-un spital sau o clinică de obstetrică și ginecologie când vârsta sarcinii este de 15-20 săptămâni (optim la 16-18 săpt.).

Înainte de aplicarea acestei proceduri medicul efectuează o scanare ecografică (ultrasonografie) care va releva imagini despre uter, placenta, lichidul amniotic și fetus. După vizualizare, medicul va introduce un ac extrem de fin, străbătând peretele abdominal al femeii, în uter, și va preleva aproximativ 5-20 ml de lichid amniotic. Această etapă durează doar câteva minute. După prelevarea probei se efectuează o nouă verificare ecografică a stării fătului [4].

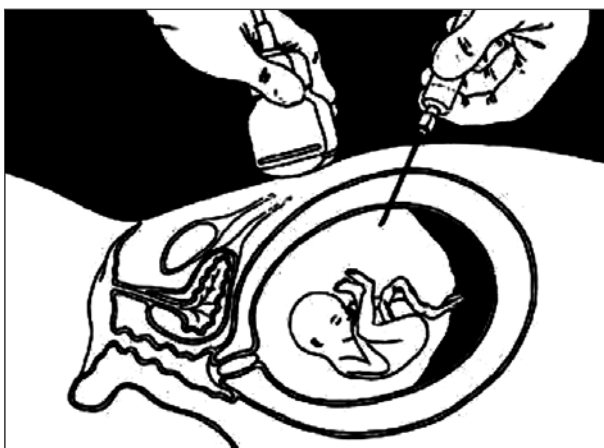


Fig.1: Amniocenteza

Amniocenteza a devenit o metodă de rutină la începutul anilor 1970. Amniocenteza nu este total exceptată de riscuri.

Celulele din lichidul amniotic descumate din tegumentele și mucoasele fătului sunt cultivate în condiții speciale și apoi testate pentru prezența anomaliilor cromozomale, în cazul cariotipării. Amniocitele pot fi examinate și fără necesitatea cultivării, în cazul metodei FISH sau QF-PCR.

Fiecare metodă de diagnostic are atât avantaje cât și dezavantaje, de aceea selectarea metodei optime de diagnostic trebuie făcută în urma unei consilieri, în comun cu medicul ginecolog și genetician.

**QF-PCR = Quantitative Fluorescent PCR (PCR fluorescent cantitativ):** Avantajele metodei constau în rapiditatea obținerii rezultatului, care poate fi efectuat în câteva ore, și ne mai oferă informația privitor la sexul fătului. Precizia metodei este de circa 99,5%. Pentru analiza QF-PCR sunt necesare doar 2-3 ml de lichid amniotic, prelevați prin amniocenteză. Analiza se poate face de la 14 săptămâni de sarcină. Avantajul față de metoda FISH este faptul că analiza probelor este automatizată, ceea ce micșorează costurile [2].

Prin metoda QF-PCR la analizorul genetic automatizat este analizat ADN-ul fetal, mai exact sunt amplificați prin PCR multiplex (*reacția de polimerizare în lanț*), iar ulterior analizați 28 de markeri STR (*short tandem repeats*) – loci specifici pentru cromozomii 13,

18, 21, X și Y. Pe baza electroforegramelor obținute în urma electroforezei capilare la secvențiator (analizor genetic automatizat) și procesării datelor într-un soft specializat, se poate elibera concluzia privitor la lipsa sau prezența aneuploidiilor pentru cromozomii 13, 18, 21, X și Y [5].

În mod normal raportul între alelele aceluiași marker este de 1:1, se admite un interval de limite care să se încadreze între 0.8 - 1.4, pentru ca raportul să fie considerat normal.

Intervalul trialelic este caracteristic în cazul trisomiilor. Trei alele sunt evidente prin trei vârfuri (peak-uri) într-un raport de 1:1:1 (Fig.2,a), sau două alele în raport de 2:1 sau 1:2 (Fig.2,b).

În cazul apariției doar a unei alele, adică a unui singur vârf (peak) pentru un marker, respectivul marker este considerat non-informativ.



Fig.2,a: QF-PCR, trei alele în raport de 1:1:1



Fig.2,b: QF-PCR, două alele în raport de 1:2

Pentru a interpreta un rezultat, este important să existe o coerență între toți markerii specifici aceluiași cromozom [5].

**Cariotipul fetal:** metoda cariotipării constă în prelevarea lichidului amniotic și punerea acestuia în mediu de cultură cu obținerea de metafaze și studierea lor. Mai întâi se efectuează puncția amniotică (amniocenteza), sub ghidaj ecografic în timp real. La amniocenteză se prelevează aproximativ 5-20 ml lichid amniotic care conține amniocite, ce vor fi cultivate în medii speciale, în incubator cu CO<sub>2</sub>. Analiza cromozomilor se face cu ajutorul unui microscop, la care se atașează o cameră video pentru captarea imaginilor și prelucrarea lor ulterioară într-un soft specializat. Rezultatul este eliberat în aproximativ 2-3 săptămâni. Există riscul de infecție a culturilor de amniocite. Metoda dată nu ne oferă informații despre modificările apărute la nivelul genelor. Analiza se face în intervalul de 15-20 săptămâni de sarcină. Metoda cariotipării fetale este considerată „golden standard” (*standardul de aur*) pentru diagnosticul prenatal [4].

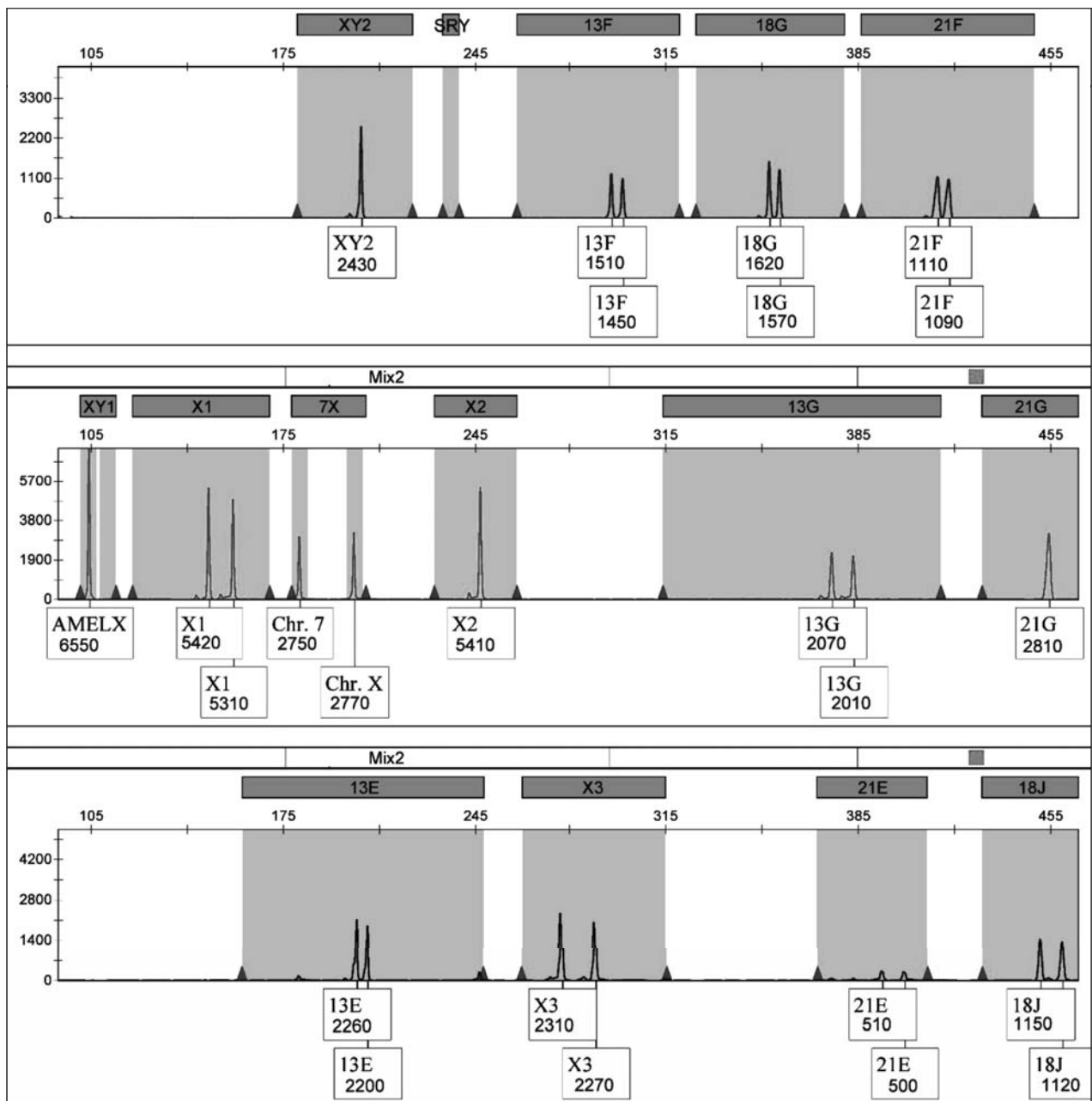


Fig. 3: QF-PCR: 46, XX – lipsa aneuploidiilor ale cromozomilor 21, 18, 13, X, Y

Cariotipul fetal se poate obține și în urma unei biopsii de vilozități coriale (CVS) care se poate face la un termen de aproximativ 10-12 săptămâni de sarcină, dar riscul de avort spontan este mult mai crescut ~ 1/100.

**FISH (hibridizarea fluorescentă in situ):** Tehnică de citogenetică moleculară care permite localizarea unei secvențe specifice de ADN într-un cromozom, utilizată în scopul identificării anomaliilor cromozomiale, numerice și structurale. Se folosesc probe oligonucleotidice marcate fluorescent pentru diagnosticul aneuploidiilor cromozomilor 13, 18, 21, X și Y. Se realizează pe nucleii interfazici, fără să fie nevoie de efectuarea de culturi celulare [5, 6].

Mai multe sindroame dismorfe (sindromul Williams, Prader-Willi, Angelman, Di George) produse de microdeleții sau microduplicații, suspectate clinic, imposibil de observat prin tehnicile citogenetice convenționale, pot fi evidențiate prin FISH-ul metafazic.

Principiul metodei constă în realizarea unei hibridizări, pe bază de complementaritate, între o secvență – țintă de ADN al cromozomului analizat și o sondă de ADN specifică marcată fluorescent. Hibridizarea sondei cu ADN-ul celular este vizualizată la microscopul cu fluorescență echipat cu filtre de excitație și emisie, ceea ce permite citirea semnalelor specifice zonei-țintă. Se numără și se analizează semnalele prezente în aproximativ o sută de celule (de ex. trei semnale

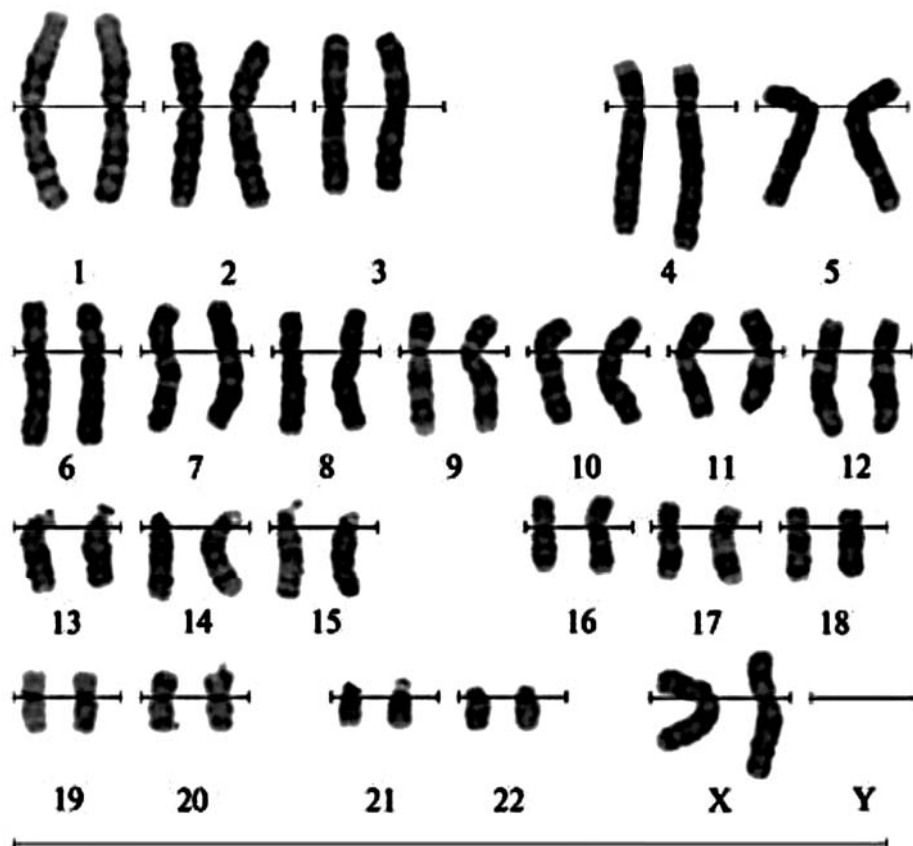


Fig.4: Cariotip: 46, XX

fluorescente specifice pentru cromozomul 21 indică sindromul Down).

Tehnica FISH a fost introdusă ca o metodă de diagnostic prenatal la începutul anilor 1990 [2].

Rezultatul se eliberează în aproximativ 2-3 zile și sunt necesari 5-10 ml de lichid amniotic. Se recomandă ca amniocenteza să se efectueze după 16 săptămâni de sarcină, când cantitatea de celule fetale în lichidul amniotic este mai mare.

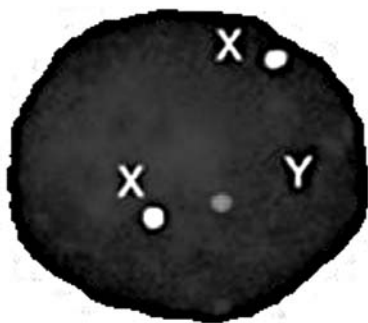


Fig.5: FISH – 47,XXY

**NIFTY - test noninvasiv al trisomiei fetale.** NIFTY este un test efectuat din sângele mamei, care detectează aneuploidiile cromozomilor 13, 18, 21, X și Y, dar și alte sindroame genetice fără a prezenta riscuri pentru făt sau mamă. Acest test neinvaziv al trisomiei fetale este un test de screening prenatal.

Principiul metodei: fragmente de ADN liber circulant (cfDNA) sunt fragmente scurte de ADN care pot fi găsite în sânge. În timpul sarcinii, fragmentele de cfDNA originare atât de la mamă cât și de la făt sunt prezente în circulația sângelui matern. ADN-ul fetal liber circulant (cffDNA – *cell free fetal DNA*) – este prezent ca o componentă minoră din totalul de cfDNA în plasma maternă [7].

Testul constă în prelevarea unei probe de sânge venos de 10 ml de la femeia însărcinată în săptămânile de sarcină 10 – 24. Din această probă de sânge periferic matern se analizează ADN-ul fetal (cffDNA) pentru a detecta anomalii cromozomiale, folosind tehnologia secvențierii de ultimă generație (NGS) cuplată cu analiza bioinformatică avansată. În cazul prezenței aneuploidiei, pe cromozomii afectați vor fi detectate mici excese sau deficite de ADN. Prin utilizarea tehnologiei de secvențiere masiv paralelă (MPS) se secvențiază milioane de fragmente de ADN atât fetale cât și maternel și se face compararea cromozomilor din eșantionul testat cu cromozomii de referință pentru a determina prezența anormalităților.

De asemenea, testul NIFTY permite testarea și pentru anumite sindroame de deleție, cum ar fi: 5p (sindromul Cri-du-Chat), 1p36, 2q33.1. Având această informație, este posibilă și identificarea sexului copilului (masculin/ feminin) [7,8].

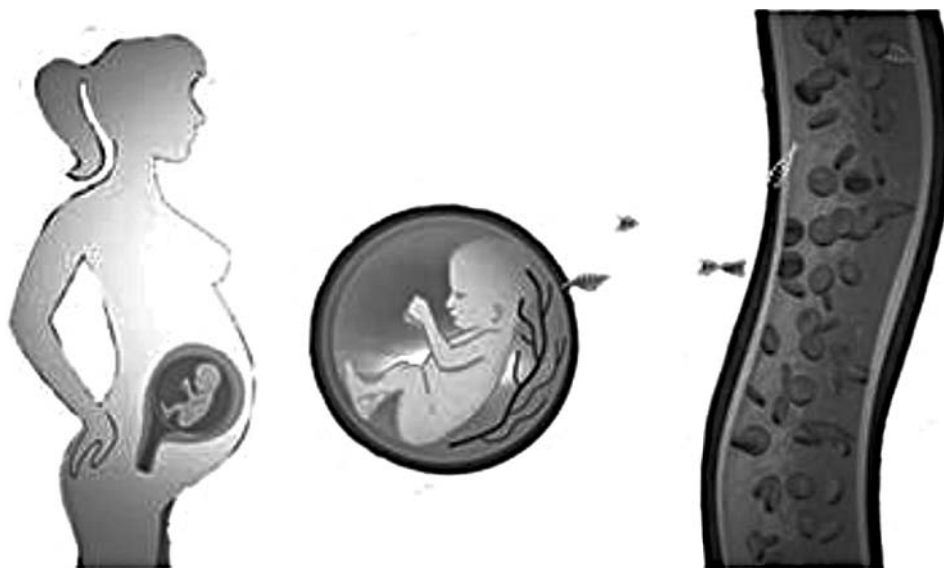


Fig.6: ADN-ul fetal liber circulant în sângele matern

**Avantajele testului NIFTY:**

- *Grad ridicat de precizie:* Se bazează pe tehnologia de analize bioinformatică secvențiale (NGS), rata de detectare >99%.

- *Neinvaziv:* Este nevoie doar de 10 ml de sânge venos matern. Prin urmare, nu există nici un risc pen-

tru o eventuală infecție intrauterină și avort.

- *Fără risc:* Evită infecția intrauterină și avortul indus.

- *Detectare incipientă:* Efectuat în primele 10 săptămâni de sarcină, acesta permite o detectare din timp pentru o mai bună decizie clinică [7].

Tabel 1

**Comparație între metodele de diagnostic și cele de screening prenatal**

Metoda	Rata de detecție, riscuri	Săptămâna de sarcină	Timp de răspuns	Test invaziv sau neinvaziv
Screening biochimic, markeri sânge matern	Rata de detecție ~60-80%, procent fals pozitiv 5%, fără risc de avort	11 - 13+6 s 15 - 20 s	1 zi	neinvaziv
Markerii ecografici în trimestrul I al sarcinii. Translucența nucală (NT)	Rata de detecție ~60-80%, Procent fals pozitiv 5%, fără risc de avort	11 - 13+6 s	rezultat în aceeași zi	neinvaziv
Amniocenteză + cariotip fetal	Rata de detecție >99%, risc de avort ~0.5%	15 - 21 s	2-3 săptămâni	invaziv
Biopsia de vilozități coriale (CVS)	Rata de detecție >99%, risc de avort ~1-2%	10 - 12 s	2-3 săptămâni	invaziv
Cordocenteza. Probă percutanată de sânge ombilical	Rata de detecție >99%, risc de avort ~0.5-1%	18 - 23 s	4-5 zile	invaziv
FISH	Rata de detecție >99%, risc de avort ~0.5%	16 - 21 s	2-3 zile	invaziv
QF-PCR	Rata de detecție >99%, risc de avort ~0.5%	14 - 24 s	1-2 zile	invaziv
NIFTY	Rata de detecție >99%, fără risc de avort	10 - 24 s	2-3 săptămâni	neinvaziv

**Concluzii.**

Se poate conchide, fără rezervă, că bolile genetice reprezintă o problemă majoră de sănătate publică impunând acțiuni concrete și eficiente de diagnostic și un program național de profilaxie a bolilor genetice bazat pe sfat genetic, screening și diagnostic prenatal.

Testarea prenatală, chiar dacă uneori poate constitui o sursă de disconfort pentru mamă și risc pentru făt, are rolul de a permite evitarea nașterii unui copil cu malformații, în baza unei consilieri genetice și a deciziilor luate de cuplu, decizia unui avort terapeutic fiind lăsată la latitudinea familiilor afectate.

Consilierea genetică este crucială pentru a ajuta pacientul să înțeleagă rezultatul testului și să-l perceapă în contextul circumstanțelor sale de viață, misiunea medicilor fiind de a îngriji și de a informa pacienții pentru luarea unor decizii corecte.

Dilema care stă în fața noastră: Genetica vs Bioetica vs Eugenism.

#### Bibliografie

1. Weaver BA, Silk AD, Cleveland DW. *Cell biology: nondisjunction, aneuploidy and tetraploidy*. Nature, 2006; 442(7104) (E9-10).

2. Neagoș Daniela, Bohîlța Laurențiu, Crețu Roxanda. *Anomalii cromozomiale umane: aspecte genetice în diagnosticul prenatal*. Editura ALL, 2013.

3. Nicolaides KH. *Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks*. Prenat Diagn, 2011; 31(1):7-15.

4. Covic Mircea, Ștefănescu Dragoș, Sandovici Ionel. *Genetică medicală*. Ediția a II-a, Ed. Polirom, 2011

5. Hamilton S., Mann K. *QF-PCR for the diagnosis of aneuploidy Best Practice Guidelines v2.01*. Association for Clinical Cytogenetics, 2007.

6. Mann K, Donaghue C, Fox S P, Docherty Z and Ogilvie C M. *Strategies for the rapid diagnosis of chromosome aneuploidy*. E J Hum Genet, 2004; 12: 907-915.

7. Broșura NIFTY test, BGI diagnostics, 2014.

8. Sparks AB, Wang ET, Struble CA, et al. *Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy*. Prenat Diagn, 2012; 32(1):3-9.

© Uliana Tabuica, Liudmila Stavinskaia

Uliana Tabuica, Liudmila Stavinskaia  
**STĂRILE DE HIPERANDROGENIE ÎN PRACTICA GINECOLOGICĂ:  
PRINCIPII DE DIAGNOSTIC ȘI TRATAMENT**

USMF „Nicolae Testemițanu”, Catedra Obstetrică și Ginecologie FECMF  
(Șef catedră – prof.univ., dr. hab. med. Olga Cernetchi)

#### SUMMARY

#### HYPERANDROGENIC SYNDROME IN GYNECOLOGICAL PRACTICE: PRINCIPLES OF DIAGNOSIS AND TREATMENT

**Key words:** hyperandrogenic syndrom, polycystic ovary syndrome, hirsutism, acne, combined oral contraceptives.

The hyperandrogenic syndrome (HAS) brings together diseases/conditions associated with excessive production of androgens in the female body, or increased sensitivity to them in hormone-dependent organs. Nosological forms of HAS range from isolated lesions of the skin to systemic diseases associated with a high risk of metabolic disorders, cardiovascular disease, infertility, hyperplastic processes of the reproductive system and cancer. Management algorithms of these patients are processed in endocrinology, gynecology and dermatology, but in actual practice, a multidisciplinary approach to the management of patients is rare. In most cases, clinicians cannot avoid polypragmasie in treatment planning, and the number of medications that can have a multi-dimensional effect is small. This determines the need of continuing the search for drugs, including hormonal treatment strategies for patients with HAS, depending on the main cause of the endocrinopathy .

#### РЕЗЮМЕ

#### ГИПЕРАНДРОГЕННЫЕ СОСТОЯНИЯ В ГИНЕКОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ: ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ

**Ключевые слова:** гиперандрогения, синдром поликистозных яичников, гирсутизм, акне, комбинированные оральные контрацептивы

Синдром гиперандрогении (СГА) объединяет ряд заболеваний/состояний, ассоциированных с избыточной продукцией андрогенов в женском организме или повышением чувствительности к ним гормонозависимых органов. Нозологические варианты СГА распределяются от изолированных поражений кожи и ее придатков до системных заболеваний, сопровождающихся высоким риском метаболических расстройств, сердечно-сосудистой и онкологической патологии, бесплодия, гиперпластических процессов репродуктивной системы.