

ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ

Βούλα Βελισσαρίου, BSc, PhD.
Κυτταρογενετίστρια, Αξιολογήτρια/Εμπειρογνώμων Ε.ΣΥ.Δ

Εισαγωγή

Η προγεννητική διάγνωση ξεκίνησε το 1966, όταν αποδείχτηκε ότι η χρωμοσωματική σύσταση ενός εμβρύου είναι δυνατό να προσδιοριστεί με ανάλυση του καρυότυπου των κυττάρων του αμνιακού του υγρού, τα οποία αναπτύσσονται σε καλλιέργεια (Steele and Breg, 1966). Ο καρυότυπος του εμβρύου αποτελεί μέχρι σήμερα πολύτιμο εργαλείο για τη διάγνωση των χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Η συχνότερη αριθμητική χρωμοσωματική ανωμαλία είναι η τρισωμία 21, κλινική εκδήλωση της οποίας αποτελεί το σύνδρομο Down, με συχνότητα 1/800 γεννήσεις. Υψηλή συχνότητα συναντάται και στις αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων του φύλου (EUROCAT; Schinzel, 2001; Gardner et al., 2012). Με το συμβατικό καρυότυπο ανιχνεύονται όλες οι αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες, καθώς και οι δομικές ανωμαλίες/αναδιατάξεις μεγέθους $\geq 5\text{-}10\text{Mb}$. Με τις τεχνικές σήμανσης και αναγνώρισης των χρωμοσωμάτων, το μέγεθος αυτό αντιστοιχεί περίπου σε μια ζώνη κατά μήκος ενός χρωμοσώματος (ISCN, 2013). Χρωμοσωματικά μικροελλείμματα και μικροδιπλασιασμοί τα οποία είναι κάτω των ορίων της διακριτικής ικανότητας του συμβατικού καρυότυπου και ευθύνονται για την κλινική εκδήλωση σοβαρών συνδρόμων, με συχνότητα περίπου 17 στις 10,000 γεννήσεις στο γενικό πληθυσμό (Park et al., 2013), ανιχνεύονται σήμερα με μεθοδολογίες όπως τις FISH (Fluorescent In Situ Hybridization, φθορίζουσα υβριδοποίηση in situ), MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, ενίσχυση πολλαπλών ανιχνευτών εξαρτώμενη από την αντίδραση λιγάσης) και Array-CGH (Array Comparative Genomic Hybridization, συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση με συστοιχίες - Μοριακός Καρυότυπος) (Fan, 2002; Bejjani et al., 2005).

Αναγκαία προϋπόθεση για το γενετικό έλεγχο του εμβρύου αποτελεί η λήψη εμβρυϊκών ιστών με επεμβατικές μεθόδους, όπως με λήψη χοριονικών λαχνών – τροφοβλάστης (11^η-14^η εβδομάδα της κύησης), αμνιακού υγρού (αμνιοπαρακέντηση, 16^η-22^η εβδ.), ή εμβρυϊκού αίματος μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης. Με τις μεθόδους αυτές είναι δυνατόν να μελετήσουμε τα χρωμοσώματα του εμβρύου καθώς και να απομονώσουμε DNA από τα εμβρυϊκά κύτταρα και να διαγνώσουμε βλάβες σε συγκεκριμένα γονίδια που ευθύνονται για γνωστές γενετικές ασθένειες (μεσογειακή αναιμία, κυστική ίνωση, αχονδροπλασία κ.α).

Πιστοποίηση και διαπίστευση Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής

Απαραίτητη προϋπόθεση για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων στην κυτταρογενετική διάγνωση αποτελεί η εύρυθμη λειτουργία του εργαστηρίου σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα. Το κατάλληλο πρότυπο για τα κλινικά εργαστήρια είναι το ISO 15189. Όπως ισχύει διεθνώς για όλα τα κλινικά εργαστήρια, απαραίτητη θεωρείται η πιστοποίηση (certification) του εργαστηρίου και η διαπίστευση συγκεκριμένων διαδικασιών (accreditation). Στη χώρα μας ο υπεύθυνος εθνικός φορέας για τα παραπάνω είναι το Ε.ΣΥ.Δ, (Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης) (Κρούτης, 2009). Ειδικότερα για την προγεννητική κυτταρογενετική διάγνωση, απαραίτητη είναι η συμμόρφωση με τις οδηγίες ειδικών φορέων οι οποίοι τις έχουν καταγράψει με μεγάλη λεπτομέρεια (Eurogenetest, A.C.C., E.C.A.). Στις παραπάνω οδηγίες περιγράφονται: η απαραίτητη υποδομή του εργαστηρίου σε εξοπλισμό και προσωπικό, οι κανόνες όσον αφορά στη χρήση των καλλιεργητικών υλικών και οι διαδικασίες παρασκευής των χρωμοσωμάτων σύμφωνα με τα πρωτόκολλα, ο τρόπος ανάλυσης των χρωμοσωμάτων, η αξιολόγηση των ευρημάτων, η ορθή καταγραφή των αποτελεσμάτων κατά ISCN (2013) και τέλος ο ορθός τρόπος γραφής της τελικής έκθεσης. Τέλος, απαραίτητη θεωρείται η συμμετοχή του εργαστηρίου σε εξωτερικά σχήματα ελέγχου ποιότητας όπως το CEQAS (Cytogenetic External Quality Assessment Service) ή το C.A.P. (College of American Pathologists). Σημειώνεται ότι σε περίπτωση πιστοποίησης και διαπίστευσης από το Ε.Σ.Υ.Δ. οι αξιολογητές/εμπειρογνώμονες θεωρούν απαραίτητα όλα τα παραπάνω.

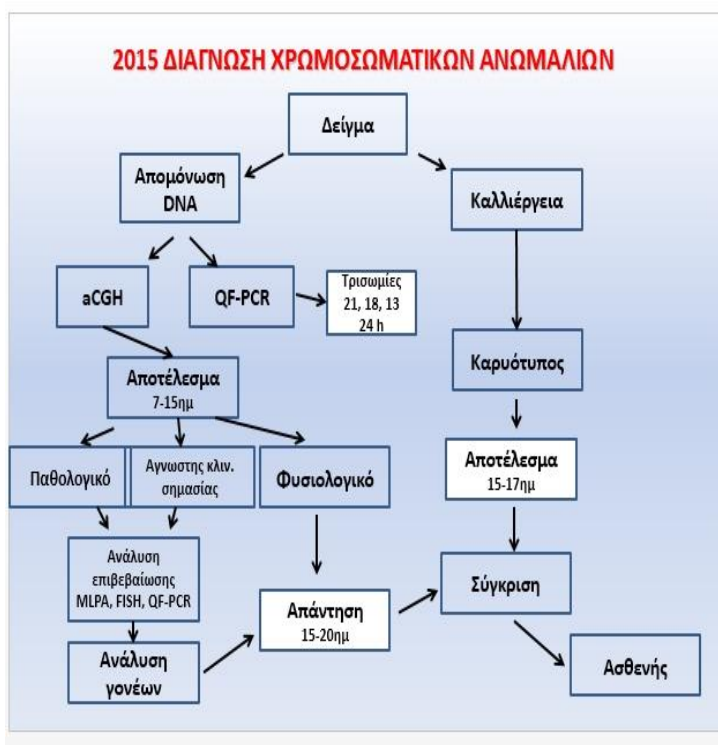
Προγεννητικός καρυότυπος

Η χρωμοσωματική κυτταρογενετική ανάλυση του εμβρύου με τον καρυότυπο πραγματοποιείται κατόπιν καλλιέργειας των εμβρυϊκών κυττάρων η οποία απαιτεί συνήθως 10-15 ημέρες, γεγονός το οποίο παρατείνει την αγωνία των γονέων. Επειδή στην προγεννητική διάγνωση εκτός από την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων κρίσιμο στοιχείο αποτελεί και η ταχύτητα, τα τελευταία έτη έχουν αναπτυχθεί μεθοδολογίες οι οποίες επιτρέπουν την ταχεία εξαγωγή ενός αποτελέσματος, όσον αφορά στις συχνότερες αριθμητικές ανωμαλίες του εμβρύου, δηλαδή στις τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 13, 18, 21 και στις ανευπλοειδίες των χρωμοσωμάτων του φύλου. Η πλέον διαδεδομένη μέθοδος ταχείας προγεννητικής διάγνωσης είναι η ποσοτική φθορίζουσα αντίδραση της πολυμεράσης (QF-PCR: quantitative fluorescent polymerase chain reaction) (Mann and Ogilvie, 2012).

Σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες και τη διεθνή πρακτική κατά την προγεννητική διάγνωση των χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου στο δείγμα το οποίο παραλαμβάνεται από το εργαστήριο (χοριακές λάχνες, αμνιακό υγρό, εμβρυϊκό αίμα),

εφαρμόζεται αρχικά η ταχεία προγεννητική διάγνωση συνήθως με QF-PCR και στη συνέχεια ακολουθεί μελέτη καρυότυπου κατόπιν καλλιέργειας. Σε περίπτωση ευρήματος στον καρυότυπο, ενδέχεται να ζητηθεί κυτταρογενετικός έλεγχος των γονέων, προκειμένου να διαπιστωθεί αν το εύρημα είναι οικογενές ή *de novo*. Η εφαρμογή της μεθόδου array CGH (μοριακός καρυότυπος) συνιστάται σχεδόν πάντα στις περιπτώσεις όπου έχουν περιγραφεί υπερηχογραφικά ευρήματα, ενώ γίνεται συζήτηση για την ευρύτερη χρήση της και σε άλλες τις περιπτώσεις (ACOG; Eurogenetest; Brady et al., 2012; Vannaker et al., 2014; Konialis and Pangalos, 2015). Στο Σχ. 1 απεικονίζεται η ροή των εργαστηριακών διαδικασιών ενός δείγματος προγεννητικής διάγνωσης χρωμοσωματικών ανωμαλιών.

Η εργαστηριακή προγεννητική διάγνωση των χρωμοσωματικών ανωμαλιών και μελέτη καρυότυπου του εμβρύου απαιτεί τη συμμόρφωση με τα διεθνή πρότυπα, τη συνεχή ενημέρωση και επιμόρφωση όλων των εμπλεκόμενων, τη στενή συνεργασία με άλλες ειδικότητες όπως κλινικούς γενετιστές, υπερηχογραφιστές, μαιευτήρες-γυναικολόγους, γενετικούς συμβούλους καθώς και παιδιάτρους. Ο κυτταρογενετιστής οφείλει να είναι σε θέση να παρατηρεί με προσοχή τα χρωμοσώματα, να είναι σε θέση να αναγνωρίσει τυχόν χρωμοσωματικές ανωμαλίες/αναδιατάξεις και να αξιολογεί τα αποτελέσματα της ταχείας προγεννητικής διάγνωσης και του array CGH σε κάθε περιστατικό. Επίσης, οφείλει να αξιολογεί την κλινική σημασία των κυτταρογενετικών ευρημάτων λαμβάνοντας υπόψιν τις αιτίες παραπομπής και το ιστορικό του/της εξεταζομένου/ης.



Σχ. 1. Ροή εργαστηριακών διαδικασιών για τη διάγνωση χρωμοσωματικών ανωμαλιών.

Βιβλιογραφία

A.C.C. Association for Clinical Genetics. (2009). Professional Guidelines for Clinical Genetics. Prenatal Diagnosis Best Practice Guidelines. V1.00. <http://www.acgs.uk.com>

A.C.O.G. The American College of Obstetricians and Gynecologists. (2013). Committee opinion on the Use of Microarray Analysis in Prenatal Diagnosis. <http://www.acog.org>

Bejjani, B.A., Theisen, A.P., Ballif, B.C., Shaffer, L.G. (2005). Array-based comparative genomic hybridization in clinical diagnosis. Expert Rev. Mol. Diagn. 5(3), 421-9. Review.

Brady, P.D., Devriendt, K., Deprest, J., Vermeesch, J.R. (2012). Array-based approaches in prenatal diagnosis. Methods Mol. Biol. 838, 151-171.

C. A. P. College of American Pathologists. Proficiency Testing External Quality Assurance. <http://www.cap.org>

CEQAS. Cytogenetic External Quality Assessment Service. <http://www.ceqas.org>

E.C.A. European Cytogeneticists Association. (2012). General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics. A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations. E.C.A. Permanent Working Group for Cytogenetics and Society Newsletter No. 29. <http://www.e-c-a.eu>

E.ΣΥ.Δ. Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης. <http://esyd.gr>

EUROCAT. European surveillance of congenital anomalies. <http://eurocat-network.eu> Eurogenetest. Best Practice Guidelines.

<http://eurogenetest.org>

Fan, Y.S. (2002). Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications (Methods in Molecular Biology). Humana Press, Totowa, New Jersey.

Gardner, R.J.M., Sutherland, G.R., Shaffer, L.G. (2012). Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling (4th Edition). Oxford Monographs on Medical Genetics n0. 61. Oxford University Press.

ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2013. Eds. Schaffer, L.G., McGowan-Jordan, J., Schmid, M. Karger.

Mann, K., Ogilvie, C.M. (2012). QF-PCR: application, overview and review of the literature. Prenat. Diagn. 32(4), 309-314.

Konialis, C., and Pangalos, C. (2015). Dilemmas in Prenatal Chromosomal Diagnosis Revealed Through a Single Center's 30 Years' Experience and 90,000 Cases. Fetal Diagn. Ther. 38(3), 218-232.

Κρούπης, Χ. (2009). Διαπίστευση κλινικών εργαστηρίων κατά ISO 15189. Ενημερωτικό Δελτίο Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής Χημείας και Κλινικής Βιοχημείας. <http://www.eekx-kb.gr>.

Park, S.J., et al. (2013). The clinical application of array CGH for the detection of chromosomal defects in 20,126 unselected newborns. Mol. Cytogenet. 6, 21.

Steele, M.W., Breg, W.R. (1966). Chromosome analysis of human amniotic cells. Lancet. 1 (7434), 383-385.

Shinzel, A. (2001). Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man (2nd Edition). Walter de Gruyter. Berlin-New York.

Vannaker, O. et al. (2014). Implementation of genomic arrays in prenatal diagnosis: The Belgian approach to meet the challenges. Eur. J Med. Genet. 57 151e156. Review.