

## Κατευθυντήριες οδηγίες για τη διεξαγωγή Προγεννητικής Χρωμοσωμικής Ανάλυσης με Μοριακό Καρυότυπο (CMA Chromosomal Microarray Analysis)

Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Ε.Κ.Π.Α. και Σ.Ι.Γ.Ε.

Σεπτέμβριος 2023

### I. Γενικά

Η χρωμοσωματική ανάλυση με μοριακό καρυότυπο CMA (Chromosomal Microarray Analysis) (SNP array και aCGH) παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης ανευπλοειδιών, αλλαγών αριθμού αντιγράφων (Copy Number Variants, CNVs) και μη ισοζυγισμένων χρωμοσωματικών αναδιατάξεων. Επιπρόσθετα, με τη χρήση μικροσυστοιχιών SNP (SNP array) ή υβριδικών μικροσυστοιχιών CGH+SNP παρέχεται η δυνατότητα ανίχνευσης περιοχών απώλειας ετεροζυγωτίας (Loss of Heterozygosity, LOH) καθώς και πολυπλοειδιών. Ήδη από το 2010 η μέθοδος αποτελεί διαγνωστική εξέταση πρώτης γραμμής (first-tier test) για ασθενείς με νευροαναπτυξιακές διαταραχές, νοητική υστέρηση, διαταραχές του αυτιστικού φάσματος ή/και συγγενείς ανωμαλίες, καθώς προσφέρει αυξημένη διαγνωστική απόδοση τουλάχιστον 15% επιπλέον σε σχέση με τον συμβατικό καρυότυπο. Η εφαρμογή της μεθόδου στην προγεννητική διάγνωση μετά από επεμβατική λήψη αμνιακού υγρού ή χοριακών λαχνών ενδείκνυται σε συγκεκριμένες περιπτώσεις (βλ. Ενότητα II: Ενδείξεις).

Το παρόν έγγραφο περιλαμβάνει συστάσεις και κατευθυντήριες οδηγίες για την διεξαγωγή προγεννητικής χρωμοσωμικής ανάλυσης με μοριακό καρυότυπο από διαγνωστικά εργαστήρια Γενετικής και στοχεύει στην εναρμόνιση των πρακτικών ανάλυσης, ερμηνείας και αναφοράς των αποτελεσμάτων.

Οι συγγραφείς έλαβαν υπόψη τις δημοσιευμένες συστάσεις και κατευθυντήριες οδηγίες επιστημονικών συλλόγων και εταιριών της Ευρώπης, των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής και του Καναδά (ACMG, ESHG, CCMG, ACOG).

### II. Ενδείξεις

Η προγεννητική χρωμοσωμική ανάλυση με μοριακό καρυότυπο ενδείκνυται:

- i. Σε κυήσεις με μία ή περισσότερες μείζονες δομικές ανωμαλίες του εμβρύου κατά τον υπερηχογραφικό έλεγχο 1<sup>ου</sup> και 2<sup>ου</sup> τριμήνου
- ii. Σε κυήσεις με αυξημένη αυχενική διαφάνεια (>3.5mm)
- iii. Σε κυήσεις με παθολογικά ευρήματα κατά τον βιοχημικό έλεγχο 1<sup>ου</sup> τριμήνου
- iv. Σε κυήσεις υψηλού κινδύνου για χρωμοσωμικές ανωμαλίες μετά από αμφίβολα αποτελέσματα από μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο (Non Invasive Prenatal Testing, NIPT)

- v. Σε περιπτώσεις οικογενειακού ιστορικού για χρωμοσωμική ανωμαλία ή ανακατάταξη (π.χ. πάσχον τέκνο, προηγούμενη κύηση με χρωμοσωμική ανωμαλία, συγγενής με χρωμοσωμική ανωμαλία, γονέας με ισοζυγισμένη μετάθεση)
- vi. Σε κυήσεις με αυξημένη μητρική ηλικία
- vii. Προληπτικά, λόγω άγχους του ζευγαριού

Επιπρόσθετα, χρωμοσωμική ανάλυση με μοριακό καρυότυπο μπορεί να πραγματοποιηθεί και στις περιπτώσεις θνησιγενών εμβρύων ή/και σε δείγμα προϊόντος αποβολής.

### III. Συστάσεις ορθής πρακτικής για τα διαγνωστικά εργαστήρια

- Οι προδιαγραφές του εξοπλισμού, των εγκαταστάσεων, του προσωπικού και της διαγνωστικής διαδικασίας οφείλουν να συμμορφώνονται με το ISO15189. Επιπρόσθετα, όλες οι διαδικασίες πριν και μετά την εξέταση πρέπει να ακολουθούν γραπτά πρωτόκολλα (Standard Operating Procedures, SOPs). Το προσωπικό οφείλει να έχει αποδεδειγμένη εμπειρία στη χρωμοσωμική ανάλυση με μοριακό καρυότυπο τόσο προγεννητικών όσο και μεταγεννητικών δειγμάτων.
- Τα διαγνωστικά εργαστήρια οφείλουν να διασφαλίσουν ότι οι αναλύσεις πραγματοποιούνται από εξειδικευμένους επιστήμονες με πιστοποιημένη εκπαίδευση στην Εργαστηριακή Γενετική. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να αναλύονται από 2 ξεχωριστά άτομα.
- Τα δείγματα συνοδεύονται από έντυπο παραπομπής όπου αναγράφεται με σαφήνεια η ζητούμενη εξέταση, η αιτία παραπομπής, ο αναλυτικός κλινικός φαινότυπος (Υπερηχογραφικά και βιοχημικά ευρήματα) του εμβρύου και οι λεπτομέρειες του οικογενειακού ιστορικού.
- Η ανάλυση πραγματοποιείται κατά προτίμηση σε φρέσκο δείγμα χοριακών λαχνών ή αμνιακού υγρού ή σε ειδικές περιπτώσεις σε δείγμα το οποίο έχει καλλιεργηθεί. Συνιστάται η πραγματοποίηση εφεδρικής καλλιέργειας για όλα τα προγεννητικά δείγματα και η διατήρηση της μέχρι την συγγραφή της τελικής έκθεσης αποτελεσμάτων για την περίπτωση αποτυχίας της ανάλυσης στο φρέσκο δείγμα, την ανάγκη εκτίμησης του ποσοστού μωσαϊκισμού σε ανεξάρτητη καλλιέργεια και την πιθανότητα να απαιτηθεί ανάλυση FISH για επιβεβαίωση ευρημάτων.
- Το ενδεχόμενο ύπαρξης επιμόλυνσης του δείγματος από μητρικά κύτταρα πρέπει να αποκλείεται για κάθε περιστατικό μέσω γονοτύπησης με τη χρήση πολυμορφικών δεικτών. Μητρική επιμόλυνση σε δείγμα αμνιακού υγρού μπορεί να προκύψει από την παρουσία μητρικού αίματος και σε δείγμα χοριακών λαχνών από την παρουσία μητρικού ιστού.
- Για την αποφυγή λανθασμένης διάγνωσης σε δείγμα χοριακών λαχνών λόγω μωσαϊκισμού περιορισμένου στον πλακούντα (Confined Placental Mosaicism, CPM) συνιστάται η ανάλυση ετερογενούς πληθυσμού κυττάρων, με τη χρήση πολλαπλών λαχνών κατά την απομόνωση DNA.

- Ο χρόνος για την παράδοση των αποτελεσμάτων δεν θα πρέπει να ξεπερνάει τις 14 ημερολογιακές ημέρες.
- Η έκθεση αποτελεσμάτων συνιστάται να περιλαμβάνει τα ευρήματα σύμφωνα με την ονοματολογία κατά ISCN (International System for Human Cytogenomic Nomenclature).
- Οι απαντητικές εκθέσεις πρέπει να περιλαμβάνουν τις παρακάτω πληροφορίες:
  - Αιτία παραπομπής
  - Ημερομηνία δειγματοληψίας, παραλαβής δείγματος και απάντησης
  - Τουλάχιστον δύο διακριτά στοιχεία ταυτοποίησης του δείγματος (π.χ. όνομα και ημερομηνία γέννησης)
  - Κωδικό δείγματος
  - Παραπέμπων ιατρός / νοσοκομείο
  - Είδος δείγματος
  - Σύνοψη των αποτελεσμάτων
  - Αναλυτική αναφορά των αποτελεσμάτων
  - Ερμηνεία των αποτελεσμάτων
  - Μεθοδολογία, με λεπτομερή αναφορά στην πλατφόρμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση καθώς και τους περιορισμούς της μεθόδου
  - Όνομα και υπογραφή τουλάχιστον δύο εξουσιοδοτημένων προσώπων συμπεριλαμβανομένου ενός Εργαστηριακού Γενετιστή.
  - Αρίθμηση σελίδων
- Στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να αναφέρεται αν το εύρημα είναι σχετικό με την αιτία παραπομπής, το σύνδρομο ή νόσημα με το οποίο σχετίζεται καθώς και συστάσεις για περαιτέρω έλεγχο όπου αυτό είναι απαραίτητο.
- Συνιστάται η αναφορά των γονιδίων που βρίσκονται εντός των παθολογικών ευρημάτων. Για αδρές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις μεγάλου μεγέθους είναι αποδεκτό να αναφερθούν τα σημαντικότερα γονίδια που σχετίζονται με την αιτία παραπομπής.
- Συνιστάται η χρήση μικροσυστοιχιών που περιέχουν τουλάχιστον 60.000 ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές και παρέχουν διακριτική ικανότητα στο εύρος όλου του γονιδιώματος >200Kb.
- Για την αξιολόγηση των ευρημάτων είναι απαραίτητη η χρήση δημόσια διαθέσιμων βάσεων δεδομένων (π.χ. ClinGen, ClinVar, Database of Genomic Variants, DECIPHER) καθώς και βάσεων δεδομένων με σημειακές παραλλαγές και ενθέσεις και απαλοιφές (indels) στα γονίδια τα οποία εμπλέκονται σε ένα CNV. Επιπρόσθετα, συνιστάται η τήρηση εσωτερικής βάσης δεδομένων κάθε εργαστηρίου.
- Η χρήση μικροσυστοιχιών υψηλότερης ανάλυσης (CGH & SNPs) συνιστάται σε περιπτώσεις που υπάρχει εσωτερική βάση δεδομένων του εργαστηρίου με μεγάλο αριθμό δειγμάτων (προγεννητικών και μεταγεννητικών) που έχουν αναλυθεί με την ίδια πλατφόρμα, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα συσχέτισης γονοτύπου-φαινοτύπου ακόμη και για ευρήματα <200Kb.

- Κάθε ανάλυση θα πρέπει να ικανοποιεί τα ποιοτικά κριτήρια (QC metrics) που έχουν θεσπιστεί από το εργαστήριο και τις προδιαγραφές του κατασκευαστή, όπως DLRS, Signal Intensity, Signal-to-noise ratio κλπ.
- Τα ευρήματα κατατάσσονται σε 5 κατηγορίες σύμφωνα με τις οδηγίες του ACMG: Μη παθολογικά (B), Πιθανώς μη παθολογικά (LB), Αβέβαιης Κλινικής Σημασίας (VUS), Πιθανώς Παθολογικά (LP) και Παθολογικά (P), με βάση χαρακτηριστικά όπως το γονιδιακό περιεχόμενο, η απλοανεπάρκεια ή τριπλοευαισθησία των εμπλεκόμενων χρωμοσωμικών περιοχών (& σημαντικών γονιδίων που βιβλιογραφικά αναφέρονται να συνεισφέρουν σε νοσήματα), το πρότυπο κληρονόμησης κ.α. Το ενδεχόμενο μειωμένης διεισδυτικότητας ή/και ποικίλης εκφραστικότητας θα πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψιν κατά την αξιολόγηση των ευρημάτων.
- Μη παθολογικά (B) και πιθανώς μη παθολογικά (LB) ευρήματα συνιστάται να μην αναφέρονται στην έκθεση αποτελεσμάτων.
- Περιοχές με απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) συνιστάται να αναφέρονται στην έκθεση αποτελεσμάτων όταν έχουν μέγεθος >10Mb και είναι ενδεικτικές μονογονεϊκής δισωμίας ή συγγένειας των γονέων. Αν αφορά πολλαπλά χρωμοσώματα μπορεί να αναφερθεί το συνολικό μέγεθος των περιοχών που βρίσκονται σε ομοζυγωτία (π.χ. 150Mb). Σημειώνεται ότι η LOH ανευρίσκεται μόνο με την χρήση υβριδικών μικροσυστοιχειών CGH & SNPs.
- Οι περιορισμοί της μεθόδου θα πρέπει να αναγράφονται με σαφήνεια στην απαντητική έκθεση. Ο μοριακός καρυότυπος δεν είναι σε θέση να ανιχνεύσει ισοζυγισμένες ανακατατάξεις, μωσαϊκισμό <15-20%, σημειακές αλλαγές (SNPs), νουκλεοτιδικές επεκτάσεις καθώς και πολυπλοειδίες και μονογονεϊκή δισωμία (εκτός των περιπτώσεων ανάλυσης με μικροσυστοιχίες CGH & SNPs). Επίσης, η μέθοδος δεν ανιχνεύει αλλαγές σε περιοχές που δεν καλύπτονται από ανιχνευτές (π.χ. κεντρομερίδια, ετεροχρωματίνη) καθώς και αλλαγές του προτύπου μεθυλίωσης ή της γονιδιακής έκφρασης.
- Συνιστάται η επιβεβαίωση της διαγνωστικής ικανότητας μιας νέας πλατφόρμας μικροσυστοιχιών κατ'ελάχιστο σε 30 δείγματα με γνωστές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις πριν την κλινική εφαρμογή.
- Συνιστάται η οπτική εξέταση των δεδομένων της ανάλυσης πέραν της αυτοματοποιημένης ταυτοποίησης από το λογισμικό ανάλυσης, για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.
- Τα ευρήματα αβέβαιης κλινικής σημασίας (VUS) συνιστάται να αναφέρονται μόνο σε περιπτώσεις που υπάρχουν δημοσιευμένα στοιχεία σχετικά με την παθογονικότητα τους, ακόμη και αν αυτά δεν είναι πλήρη.
- Τα εργαστήρια οφείλουν να συμμετέχουν σε προγράμματα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου από πιστοποιημένους παρόχους (GenQA, UKNeqas κλπ). Επίσης, συνιστάται η θεσμοθέτηση εσωτερικών διαδικασιών ποιοτικού ελέγχου σε κάθε εργαστήριο.

#### IV. Γενετική συμβουλευτική πριν και μετά την εξέταση (Pre- & Post-test counseling)

Όπως με όλες τις γενετικές εξετάσεις, οι ενδιαφερόμενοι πρέπει να δώσουν έγγραφη συγκατάθεση για τον γενετικό έλεγχο, μετά από ενημέρωση. Για το λόγο αυτό, η γενετική συμβουλευτική πριν την εξέταση είναι ουσιώδους σημασίας. Γενετική συμβουλευτική μπορεί να δοθεί από κλινικό γενετιστή, ή κλινικό εργαστηριακό επιστήμονα με εκπαίδευση στο πεδίο της γενετικής διάγνωσης.

Οι ενδιαφερόμενοι πρέπει να ενημερωθούν για τον σκοπό της εξέτασης, την αρχή της μεθόδου, τις παραλλαγές οι οποίες ανιχνεύονται, την διακριτική ικανότητα και τους περιορισμούς, τον χρόνο ολοκλήρωσης της εξέτασης, το κόστος καθώς και την πολιτική αναφοράς ευρημάτων του εργαστηρίου. Η πιθανότητα ταυτοποίησης τυχαίων ευρημάτων, μη σχετιζόμενων με τον κλινικό φαινότυπο, δευτερευόντων ευρημάτων (νοσήματα όψιμης εμφάνισης) καθώς και η πιθανότητα ευρημάτων αβέβαιης κλινικής σημασίας (Variants of Uncertain Significance, VUS) πρέπει να συζητηθούν με τους ενδιαφερόμενους ώστε οι συνέπειες τέτοιων ευρημάτων τόσο για τους ίδιους όσο και το συγγενικό τους περιβάλλον να είναι πλήρως κατανοητές. Συνιστάται η παροχή δυνατότητας μη ενημέρωσης για τυχαία ή δευτερογενή ευρήματα στο έντυπο συγκατάθεσης (opt-out). Οι ενδιαφερόμενοι θα πρέπει να ενημερώνονται για την πιθανότητα το αποτέλεσμα της εξέτασης να είναι αρνητικό και ότι αυτό δεν μπορεί να αποκλείσει την παρουσία ενός γενετικού νοσήματος που οφείλεται σε διαφορετικό τύπο παραλλαγής. Επίσης, οι ενδιαφερόμενοι πρέπει να ενημερώνονται για την πιθανότητα αποκάλυψης μη πατρότητας ή συγγένειας των γονέων μέσα από τη διαδικασία της γενετικής ανάλυσης και τον τρόπο αναφοράς τέτοιων αποτελεσμάτων. Τυχόν εναπομείναντα δείγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ερευνητικούς σκοπούς ή ανάπτυξη νέων πρωτοκόλλων μόνο μετά από ρητή συγκατάθεση του ζευγαριού.

Η γενετική συμβουλευτική μετά την εξέταση τόσο στην περίπτωση αρνητικού όσο και θετικού αποτελέσματος είναι εξίσου σημαντική και αποσκοπεί στο να βοηθηθούν οι ενδιαφερόμενοι στην κατανόηση των αποτελεσμάτων ώστε να είναι σε θέση να λάβουν ενημερωμένες αποφάσεις. Κατά τη διαδικασία αυτή οι ενδιαφερόμενοι ενημερώνονται για την υπάρχουσα γνώση γύρω από το εύρημα σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, τις κλινικές επιπτώσεις και την πρόγνωση αυτού καθώς και την πιθανότητα επανεμφάνισης σε επόμενη κύηση, μετά από έλεγχο γονεϊκών δειγμάτων ή άλλων συγγενών. Σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος μπορεί επί συγκεκριμένων ενδείξεων να συσταθεί περαιτέρω έλεγχος (π.χ. Prenatal Exome).

## V. Βιβλιογραφία

1. South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: Revision 2013. *Genet Med*. 2013;15(11):901–9.
2. Armour CM, Dougan SD, Brock JA, Chari R, Chodirker BN, Debie I, et al. Practice guideline: Joint CCMG-SOGC recommendations for the use of chromosomal microarray analysis for prenatal diagnosis and assessment of fetal loss in Canada. *J Med Genet*. 2018;55(4):215–21.
3. Silva M, de Leeuw N, Mann K, Schuring-Blom H, Morgan S, Giardino D, et al. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *Eur J Hum Genet [Internet]*. 2019;27(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41431-018-0244-x>
4. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards

for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med* [Internet]. 2020;22(2):245–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41436-019-0686-8>

5. American College of Obstetricians and Gynecologists. Committee opinion No. 682: Microarrays and Next-Generation Sequencing Technology: The Use of Advanced Genetic Diagnostic Tools in Obstetrics and Gynecology. *Obstet Gynecol*. 2016;(128):e262–8.
6. Mitrakos A, Kosma K, Makrythanasis P, Tzetis M. Prenatal Chromosomal Microarray Analysis: Does Increased Resolution Equal Increased Yield? *Genes (Basel)* [Internet]. 2023 Jul 25;14(8):1519. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4425/14/8/1519>