

Prenatálny záchyt variant so zmenou v počte kópií u plodov so zachytenými vrodenými vývojovými poruchami, v období 2015–2020 metódou Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification a mikročipovou analýzou

Prenatal detection of copy number variants in fetuses with detected congenital developmental disorders, from 2015 to 2020 by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and microarray analysis

A. Štefeková¹, P. Čapková¹, V. Curtisová¹, E. Mracká¹, H. Filipová¹, Z. Spurná¹, M. Procházka¹, M. Ľubušký², R. Pilka², R. Vrtěl¹

¹ Ústav lékařské genetiky, LF UP a FN Olomouc

² Porodnicko-gynekologická klinika LF UP a FN Olomouc

Súhrn: Cieľ: Analýza prenatálnych vzoriek za obdobie 2015–2020. Porovnanie miery detekcie klinicky relevantných variant cytogenetickou analýzou karyotypu a cytogenomickými metódami MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) a mikročipmi (CMA – chromosomal microarray).

Súbor a metodika: Analyzovaných bolo 1 029 prenatálnych vzoriek cytogenetickým hodnotením karyotypu (n = 1 029), cytogenomickými metódami MLPA (n = 144) a CMA (n = 111). Všetky nebalansované zmeny boli potvrdené metódou MLPA alebo CMA. **Výsledky:** Z analyzovaného súboru plodov, po odčítaní aneuploidii – 107 (10,40 %, n = 1 029), bolo analýzou karyotypu zachytených 22 štruktúrnych aberácií (2,39 %, n = 922) – deväť nebalansovaných zmien (0,98 %), 10 balansovaných zmien (1,08 %), jeden prípad nejasnej mozaiky (0,09 %), jeden prípad prítomnosti marker chromozómu (0,09 %) a jeden prípad diskordancie pohlavia (0,09 %). U 255 vzoriek s fyziologickým karyotypom indikovaných k cytogenomickému vyšetreniu bolo zachytených celkom osem (7,21 %, n = 111) patologických variant metódou CMA. Metódou MLPA bolo z týchto ôsmich patogénnych variant zachytených päť (3,47 %, n = 144). Celkový záchyt patogénnych variant metódami MLPA a CMA vrátane konfirmačných vyšetrení patologického karyotypu je 14 (5,14 %) a 17 (6,25 %) (n = 272). Záchyt patologických variant v skupine s izolovanými poruchami bol nižší než v skupine s mnohopočetnými poruchami (5,08 vs. 21,42 %). **Záver:** Potvrdila sa vyššia úspešnosť záchytu patologických variant so zmenou v počte kópií, metódou CMA než MLPA.

Kľúčové slová: vrodené vývojové poruchy – CMA – MLPA – varianty so zmenou v počte kópií

Summary: Objective: Analysis of prenatal samples from 2015 to 2020. Comparison detection rates of clinically relevant variants by cytogenetic karyotype analysis and cytogenomic MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) and microarray methods (CMA – chromosomal microarray).

Material and method: 1,029 prenatal samples were analyzed by cytogenetic karyotyping (N = 1,029), cytogenomic methods – MLPA (N = 144) and CMA (N = 111). All unbalanced changes were confirmed by MLPA or CMA. **Results:** From the analyzed set of fetuses, after subtraction of aneuploidies – 107 (10.40%, N = 1,029), 22 structural aberrations (2.39%, N = 922) – nine unbalanced changes (0.98%), 10 balanced changes (1.08%), one case of unclear mosaicism (0.09%), one case of presence of a marker chromosome (0.09%) and one case of sex discordance (0.09%) – were detected by karyotype analysis. A total of eight (7.21%, N = 111) pathological variants were detected by CMA in 255 samples with physiological karyotype indicated for cytogenomic examination. Five (3.47%, N = 144) of eight pathogenic variants were detected by MLPA method. The total capture of pathogenic variants by MLPA and CMA methods was 14 (5.14%) and 17 (6.25%) (N = 272), including confirmatory pathological karyotype testing. Detection of pathological variants in the isolated disorders group was lower than in the multiple disorders group (5.08 vs. 21.42%). **Conclusion:** A higher success rate for the detection of pathological copy number variation variants by the microarray method than by the MLPA method was confirmed.

Key word: congenital developmental disorders – CMA – MLPA – copy number variants

Úvod

Prenatálna diagnostika a prevencia vrodených porúch

V celkovej populácii sa vyskytuje 2–3 % narodených detí s vývojovou vrodenou poruchou [1]. Prenatálna diagnostika zahŕňa súbor vyšetrovacích metód a postupov, vďaka ktorým sa dá odhaliť prítomnosť vrodených vývojových porúch u plodu [2]. Prenatálna diagnostika kongenitálnych porúch v ČR výrazne ovplyvňuje konečnú početnosť vrodených anomálií v populácii novorodencov. V súčasnosti je trend vyšetrovať takéto poruchy v čo možno najrannejšom štádiu tehotenstva a zachytiť tak najväčší počet štruktúrnych malformácií [3]. Najčastejšie morfológické poruchy v populácii sú vrodené srdcové poruchy (VSP) [4] a tvoria až 40 % zo všetkých zachytených vrodených malformácií [5]. Prenatálny záchyt VSP má narastajúcu tendenciu, u niektorých defektov, napr. hypoplázie a výrazné poruchy srdcových komôr, je to až 100 % [6]. V približne 50 % prípadov spontánnych potratov existuje vyššia frekvencia pridružených chromozómových abnormalít, hlavne aneuploidii [7].

U niektorých typov vrodených porúch sa početnosť v novorodeneckej populácii znižuje vďaka úspešnej prenatálnej diagnostike, niektoré však aj napriek úspešnosti diagnostických postupov vykazujú vyšší záchyt alebo sú to defekty, ktoré zatiaľ nie je možné prenatálne diagnostikovať a ich početnosť sa v populácii mení [3].

Metodika prenatálneho genetického vyšetrenia plodu

Prednostne sa na genetické vyšetrenie využíva invazívny odber choriových klkov (CVS – chorionic villus sampling) a plodovej vody (amniocentéza), analýzou ktorých je možné získať najpresnejší genetický profil plodu [2], napr. metódou QF-PCR (kvantitatívna fluorescenčná PCR analýza) [8].

V súčasnej laboratórnej praxi je na prenatálne hodnotenie prítomnosti vý-

znamných variant so zmenou v počte kópií (CNV – copy number variants), najviac využívaná mikročipová analýza (CMA – chromosomal microarray) a metóda MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification). CMA má oproti konvenčnej cytogenetike svoje výhody. Poskytuje detailnejší obraz karyotypu a navyše zaznamenáva zmeny v CNVs nájdených práve u pacientov s fyziologickým karyotypom [9]. Avšak nie je možné týmito metódami zachytiť balansované prestavby, Robertsonské translokácie a inverzie. Navyše neposkytujú informáciu zahŕňajúcu umiestnenie rozsiahlej inzercie, ani jej orientáciu [10,11]. Podrobnejšiu analýzu jednotlivých génov je možné získať celogenomovým alebo celoexomovým sekvenovaním (WGS/WES – whole-genome sequencing/whole-exome sequencing) pomocou špeciálnych panelov génov [12,13]. V súčasnosti je dôležitou súčasťou skríninového vyšetrenia v tehotenstve neinvazívne genetické testovanie (NIPT – non-invasive prenatal testing) voľnej fetálnej DNA z krvného séra matky. Táto metóda sa vyznačuje vysokou senzitivitou a špecifitou v rozmedzí 92–100 % [14]. V súčasnosti je v ČR toto vyšetrenie v plnom rozsahu hradené pacientom.

CNV ako príčina genetickej poruchy

Častou príčinou genetických porúch sú zmeny v CNVs. Vyskytujú sa v rozsahu chromozómových aneuploidii až po mikroduplikácie a mikrodélacie, vrátane malých štruktúrnych variant, ktoré ovplyvňujú jednotlivé gény a exóny. V ľudskom genóme sa vyskytuje asi 10 % CNV variant [15]. Benígne CNVs sú často malé, intergénové alebo zahŕňajú gény, ktoré tolerujú zmeny v počte kópií, zatiaľ čo patogénne CNV sa nachádzajú v dôležitých génoch zapojených do vývoja [16]. Mnoho CNV variant sa vyznačuje neúplnou penetranciou a variabilnou expresivitou, čo je ovplyvnené ďalšími genetickými, epigenetickými a environmentálnymi faktormi [17].

Materiál a metodika

Na analýzu DNA boli použité prenatálne vzorky choriových klkov, plodovej vody a potratového tkaniva, od tehotných pacientok vyšetrených na Ústave lekárskej genetiky vo Fakultnej nemocnici v Olomouci alebo externých pacientok, ktorých vzorky boli poslané na Ústav lekárskej genetiky na genetickú analýzu. Všetky pacientky podpísali informovaný súhlas s výskumom. Odber vzoriek genetického materiálu prebehol za spolupráce s Centrom fetálnej medicíny vo Fakultnej nemocnici v Olomouci a analýza genetického materiálu a vyhodnotenie dát prebiehalo od roku 2015 do roku 2020 na Ústave lekárskej genetiky vo Fakultnej nemocnici v Olomouci a vybrané vzorky na pracoviskách Gennet v Prahe a Ústave molekulárnej a translačnej medicíny, Univerzity Palackého v Olomouci.

V súbore vyšetrovaných plodov bolo 441 ženského pohlavia, 581 mužského pohlavia, u štyroch vzoriek z potratového tkaniva došlo k zlyhaniu kultivácie buniek, preto nebolo možné určiť pohlavie a ďalšia genetická analýza už nebola vykonaná. U dvoch vzoriek potratového tkaniva došlo ku kontaminácii primárnej vzorky a nebolo možné stanoviť karyotyp. U jednej vzorky bola prítomná genetická diskordancia pohlavia s fenotypom.

Pre fyziologický nález v karyotype, bolo u 144 plodov indikované vyšetrenie metódou MLPA na pracovisku Ústavu lekárskej genetiky a u 111 plodov metódou CMA na externých pracoviskách Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny, Univerzity Palackého v Olomouci a Gennet v Prahe (tab. 1).

Na prvotnú analýzu genetického materiálu boli použité komerčne dodávané kity SALSA® MLPA KIT P036, P070, P245, P297, na analýzu srdcových porúch kity P250, P311 a pre ďalšie typy aberácií na základe indikácie lekára kity P424, ME028, ME030, ME032 od firmy MRC-Holand (Holandsko) a CMA a/alebo SNP (single nucleotide polymorphism) array

Tab. 1. Počet plodov analyzovaný cytogenomickými metódami (MLPA, CMA) s fyziologickým karyotypom plus doplnená konfirmačná analýza u plodov s patologickým karyotypom za obdobie 2015–2020.

Tab. 1. The number of fetuses analyzed by cytogenomic methods (MLPA, CMA) with normal karyotype plus additional confirmatory analysis of fetuses with pathological karyotype for period 2015–2020.

Fyziologický karyotyp (255)	MLPA	CMA	MLPA + CMA + Patologický karyotyp	Celkom
spolu	144	111	17	272

CMA – mikročipová analýza, MLPA – Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

Tab. 2. Zistené štruktúrne aberácie u 13 plodov. Aberácie zistené cytogenetickým hodnotením karyotypu.

Tab. 2. Structural aberrations detected in 13 fetuses. Aberrations detected by cytogenetic evaluation of karyotype.

Č. pac.	TT	Materál	Indikácia	Karyotyp/FISH	MLPA	CMA	Aberácia
A1		pv	pozitívny skrining v I. trimestri	46,XY,inv(10)(q2?2q2?5)mat	–	negatívna	inverzia
A3	10+6	cvS	hydrops plodu, cystický útvar v brušnej dutine, NT 2,8	47,XX,+mar[2]/47,XX,+7[1]/46,XX[40]	negatívna (P036,P245, P311,P250)	–	marker chromozóm
A4	12+6	cvS	susp. sy Cri du chat	46,XX,t(5;11)(p15.1;p15?2)mat	negatívna (P036, P070, P245)	–	balansovaná translokácia zdedená od matky
A5	20+0	pv	otec dieťaťa prenášač 46,XY, inv(1)(q33.3,q44), NT 2	46,XY,inv(1)(p33q44)pat	–	–	inverzia zdedená od otca
A6	21+5	pv	pozitívny Triple test	46,XX,t(5;?11)(p?15;p?15)mat	negatívna (P036, P070, ME030)	–	balansovaná translokácia zdedená od matky
A7		pv	pozitívny skrining v I. trimestri, NT8	47,XX,+mar[2]/47,-12p,+fis(12)(q10),+fis(12)(q10)[1]/46,XX, del(12)(p10)[1]/45,X,del(12)(p10)[1],45,X[1]/ chrb(5)(p?13)[1]/46,XX[26]	–	negatívna	nešpecifická mozaika
A8		pv	matka plodu DM II. Typu	45,XX,t(13,14)(q10;q10)	–	–	robertsonská translokácia
A9		cvS	matka prenášačka 45,XX, der, t(14;21)(q10;q10)	45,XY,der(14;21)(q10;q10)mat	negatívna (ME032)	–	robertsonská translokácia zdedená od matky
A10		cvS	pozitívny skrining v I. trimestri	46,XX,t(10,17)	–	–	balansovaná translokácia
A11		pv	pozitívny Triple test	46,XX,t(7;10)(q31.2;p?14)	–	negatívna	balansovaná translokácia
A12	21+3	pv	agenéza corpus callosum	46,XY,t(5;19)(q?12;p?13.2)	–	negatívna	balansovaná translokácia
A13		cvS	pozitívny skrining v I. trimestri	46,XX	–	–	UZ vyšetrením zistený chlapec de la Chapell syndróm
A14		pv	mierna hydronefróza, otec prenášač 46,XY,t(13;20)(q32;q13.3)	46,XX,t(13,20)(q32,q13.3)pat	–	–	balansovaná translokácia zdedená od otca

A – analýza príslušnou metódou nebola vykonaná, CMA – mikročipová analýza, CVS – odber choriových klkov, DM – diabetes melitus, FISH – fluorescence *in situ* hybridisation, MLPA – Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, NT – nuchálna translucencia, PV – plodová voda, TT – týždeň tehotenstva, UZ – ultrazvuk

(Illumina – San Diego, CA, USA a Affymetrix – Santa Clara, CA, USA), vrátane verifikačných testov. Vzorky boli všetkými pracoviskami analyzované na zá-

klade doporučených postupov od výrobcov.

Na cytogenetickú analýzu karyotypu boli použité nakultivované fibrob-

lasty (CVS, potratové tkanivo, plodová voda). Získané mitotické chromozómy boli po príslušnej fixácii ofarbené roztokom Giemsa – G pruhovanie, nasnímané

Tab. 3. Patogénne štruktúrne chromozomálne aberácie zachytené cytogenetickou analýzou karyotypu u deviatich plodov a overené metódami MLPA a CMA.

Tab. 3. Pathogenic structural chromosomal aberrations detected by cytogenetic karyotype analysis in nine fetuses and verified by MLPA and CMA.

Č. pac.	TT	Materiál	Indikácia	Karyotyp	MLPA	CMA	Velkosť	OMIM gény
A2(3)	13	pv	polydaktylia (6X) na HK, micromandibula, micrognatia	46,XY,del(14)(q22q23)	rsa 14q22.2 (P311,P424)x1	arr[GRCh37] 14q22.2 (52,468,517-60,202,293) × 1	7,733 Mb	BMP4
A15(5)	12+2	pv	kratšie femury, nuchálna riasa 6,20 mm, NT 4	46,XY,der(18)t(10;18)(pter+;pter-)	rsa 10p15(P036, P070,P311,P245) × 3; 18p11.3 (P070, P036,P311) × 1 rsa 22q11.2 (P311,P250, P245) × 3	–	3 Mb 11 Mb	GATA3, CELF2, ZMYND11 CLTCL1, HIRA, CDC45, CLDN5, GP1BB, TBX1, TXNRD2, DGCR8, ZNF74, KLHL22, MED15, SNAP29, LZTR1
A16(8)	12+2	cvs	prenášačstvo balansovanej chromozomálnej aberácie u otca plodu t(7,10), UZ v poriadku	46,XY,der(7)t(7;10)(q36.1;q25.1)	rsa 7q36.3(P036, P070) × 1; pat rsa 10q26.3 (P070,P036) × 3 pat	arr[GRCh37] 7q36.1-q36.3 (149,364,045-159,125,464) × 1 arr[GRCh37] 10q24.31q26.3 (102,760,989-135,434,178) × 3	9,761 Mb 32,673 Mb	VIPR2 ECHS1, PAOX
A17(12)	12+3	pv	agenéza corpus callosum, colpocefália, mierna bilat. ventrikulomegália, dve cievy v pupočníku	46,XY,del(18)(q21.1)	rsa 18q21.2q23(P036, P070, P297) × 1	arr[GRCh37] 18q21.1q23 (47223998-78012829) × 1	30,788 Mb	RBFA, TCF4, CTDP1
A18(23)	20+2	pv	inv(4) u partnera, UZ normal	46,XX, rec(4) dup(4p)inv(4)(p14q33)pat	rsa 4p16.3(P070, P245) × 3, 4q35.2(P070) × 1	–	–	PIGG/FRG1
A19(25)		cvs	u partnera balansovaná translokácia t(6;13)	46,XXder(13)t(6;13)(q?24;q34)pat	rsa 6q27(P036, P070) × 3; 13q34 (P070,P036) × 1 rsa 13q34 × 1	–	100 kb 1,3 Mb	PSMB1, TBP F7, CDC16
A20(39)		tk	missed abortion in g.h. 7-8, garv po IVF u matky 45,XX, der(13;14)(q10,q10)	46,XY, der(13;14),+14 mat	rsa 14q(P036, P070) × 3	–	–	CCNB1IP1, MTA1, PARP2
A21(40)		tk	spont. abort 17+1, retroplacentárny hematóm, akútna deciduitis, NT 4,8	46,XY,der 16t(16;21)	rsa 16p13.3 (P036, P070, CREBBP-P245) × 3, 21q22.3 (P070,P036) × 1	arr[GRCh37] 16p13.3p12.3 (105444-19222095) × 3 arr[GRCh37] 21q22.3 (43592014-4808415) × 1	19,116 Mb 4,492 Mb	POLR3K, CREBBP, PRMT2, S100B, DECR2
A22(41)		tk	UUT pre agenézu obličiek v 22. g.h, anhydramnion; močový mechúr nenaplnený, v žalúdku malé množstvo tekutiny	45,XX,-15, der(15)t(9;15)(q34;q?14)	rsa15q11.2-q13 (ME028) × 1 het	snp arr[GRCh37] 15q11.2q14 (22765628-34498589) × 1	11,732 Mb	TUBGCPS, NIPA1, MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN, SNRPN, ATP10A, GABRB3, OCA2, APBA2

 A – analýza príslušnou metódou nebola vykonaná, CMA – mikročipová analýza, HK – horná končatina, IVF – *in vitro* fertilizácia, MLPA – Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, NT – nuchálna translucencia, TT – týždeň tehotenstva, UUT – umelé ukončenie tehotenstva, UZ – ultrazvuk

Tab. 4. Podrobný súhrn výsledkov z analýzy cytogenomickými technikami (MLPA, CMA) u plodov z fyziologickým karyotypom, za obdobie 2015–2020. Uvedené sú varianty s patologickým významom, uvedené sú len OMIM gény.

Tab. 4. Detailed results summary analyzed by cytogenomics techniques (MLPA, CMA) in fetuses with normal karyotype, for the period 2015–2020. Pathological variants are listed and only OMIM genes are mentioned.

N	TT	Fenotyp	Materiál	Karyotyp	MLPA	CMA	Rozsah aberácie	OMIM gény	Syndróm
2.	–	Fallotova tetralógia	pv	46,XY,inv(9)	rsa 22q11.(P250-B2, P311-A2) × 1	–	2,1 Mb	<i>CLTCL1, HIRA25, CDC45, CLDN5, GP1BB, TBX1, TXNRD2, DGCR8, ZNF74, KLHL22, MED15, SNAP29, LZTR1</i>	22q11.2 mikrolečný syndróm
6.	16+4	megavesica, equinovarózne postavenie DK, VSD	pv	46,XY	rsa 22q11.2 (P245-B1, P250-B2, P311-A2) × 1 mat	–	2,1 Mb	<i>CLTCL1, HIRA25, CDC45, CLDN5, GP1BB, TBX1, TXNRD2, DGCR8, ZNF74, KLHL22, MED15, SNAP29, LZTR1</i>	22q11.2 mikrolečný syndróm
13.	23	cysty chorioidálneho plexu	pv	46,XY	rsa 16p11.2(P297-C1, P343-C3) × 3	arr[GRCh37]16p11.2 (29,622,813_30, 165,725) × 3 mat	0,542 Mb	<i>SLC7A5P1, SPN, QPRT, C16orf54, KIF22, MAZ, PRRT2, PAGR1, MVP, CDIPT, SEZ6L2, ASPHD1, KCTD13, TAOK2, HIRIP3, DOC2A, ALDOA, PPP4C, TBX6, YPEL3, GDDP3, MAPK3</i>	16p11.2 mikroduplikačný syndróm
16.	13	pozitívny skrining v I. trimestri, NR 3,3	cvs	46,XY	rsa 22q11.2(P250-B2) × 3	arr[GRCh37]22q11.21 (18919942_215 05417) × 3 mat	2,585 Mb	<i>PRODH, DGCR2, DGCR14, TSSK2, GSC2, SLC25A1, CLTCL1, DVL1P1, HIRA, MRPL40, UFD1L, CDC45, CLDN5, SEPT5, GP1BB, TBX1, GNB1L, TXNRD2, COMT, ARVCF, DGCR8, TRMT2A, RANBP1, ZDHHC8, RTN4R, DGCR6L, GGTLC3, RIMBP3, ZNF74, SCARF2, MED15, PI4KA, SERPIND1, SNAP29, CRKL, AIFM3, LZTR1, THAP7, P2RX6, SLC7A4, BCRP2, E2F6P2</i>	22q11.21 duplikačný syndróm
19.	–	pozitívny skrining v I. trimestri NT 3,5	cvs	46,XY	rsa 22q11.(P250-B2, P311-B1) × 3	arr[GRCh37]22q11.21 (18919942_215 05417) × 3	2,585 Mb	<i>PRODH, DGCR2, DGCR14, TSSK2, GSC2, SLC25A1, CLTCL1, DVL1P1, HIRA, MRPL40, UFD1L, CDC45, CLDN5, SEPT5, GP1BB, TBX1, GNB1L, TXNRD2, COMT, ARVCF, DGCR8, TRMT2A, RANBP1, ZDHHC8, RTN4R, DGCR6L, GGTLC3, RIMBP3, ZNF74, SCARF2, MED15, PI4KA, SERPIND1, SNAP29, CRKL, AIFM3, LZTR1, THAP7, P2RX6, SLC7A4, BCRP2, E2F6P2</i>	22q11.21 duplikačný syndróm
33.	12+5	ventrikulomegália, pozitívny skrining v I. trimestri NT 1,6	cvs	46,XY	–	arr[GRCh37]Xp22.31 (6,488,721_8,097, 511) × 0 mat	1,608 Mb	<i>PUDP, STS, VCX, PNPLA4</i>	X viazaná ichtyóza
37.	–	mnohopočtené vývojové poruchy*	tk	46,XY	–	arr[GRCh37]12q24.32q24.33 (126,301,886_133,777, 902) × 2-3[0.32] dn	7,476 Mb	<i>TMEM132D, FZD10, PIWIL1, RIMBP2, STX2, RAN, GPR133, SFSWAP, MMP17, ULK1, PUS1, EP400, NOC4L, GALNT9, P2RX2, POLE, PGAM5, GOLGA3, CHFR, ZNF26, ZNF140, ZNF10, ZNF268</i>	patologická mozaika
38.	20+5	NB chýba, spina bifida s meningo-myelokélou, pes calcaneus na ĽDK, NT 1,5	tk	46,XX	–	arr[GRCh37]2q35q36.1 (221,148,359_224, 433,293)x1 dn	3,284 Mb	<i>EPHA4, PAX3, SGPP2, FARSF, MOGAT1, ACSL3, KCNE4</i>	Waandenburgov syndróm

* dextropozícia srdca, ľavostranná bráničná hernia, ChM – Chiariho malformácia, lumbálna meningo-myelokéla, v hrudnej dutine žalúdok, slezina a celé tenké črevo, ľavá časť pľúc výrazne hypoplastická a uložená v stredovej čiare, srdce a pravá časť pľúc dislokované doprava hore a dozadu, pečeň pod bránicou. NT 2,7. – analýza príslušnou metódou nebola vykonaná, CMA – mikročipová analýza, DK – dolné končatiny, ĽDK – ľavá dolná končatina, MLPA – Multi-plex Ligation-Dependent Probe Amplification, NB – nosná kosť, NT – nuchálna translucencia, OMIM – Omin Mendelian Inheritance in Man, TT – týždeň tehotenstva, VSD – defekt komorového septa

svetelným mikroskopom Olympus BX 41 (Olympus, Japonsko) a vyhodnotené v programe Lucia Cytogenetics (Laboratory Imaging, s.r.o, Praha, ČR).

Kapilárna elektroforéza vzoriek prebiehala na prístrojoch ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) a SeqStudio (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) podľa doporučeného postupu v protokole od firmy MRC-Holand. Dáta získané kapilárnou elektroforézou boli hodnotené v komerčne dostupnom programe Coffalyser.Net (www.mlpa.com).

Výsledky

Z analyzovaného súboru plodov, po odčítaní detegovaných aneuploidii – 107 (10,40 %, n = 1 029), bolo analýzou karyotypu zachytených 22 štruktúrnych aberácií (2,39 %, n = 922) – deväť nebalansovaných zmien (0,98 %), 10 balansovaných zmien (1,08 %), jeden prípad nejasnej mozaiky (0,09 %), jeden prípad prítomnosti marker chromozómu (0,09 %) a jeden prípad diskordancie pohlavia (0,09 %) (tab. 2, 3). Všetky nebalansované zmeny boli potvrdené metódou MLPA alebo metódou CMA. U 255 vzoriek s fyziologickým karyotypom, indikovaných k cytogenetickému vyšetreniu na základe prevažne ultrasonografic-

kých nálezov u plodu, bolo zachytených celkom osem patologických variant (7,21 %, n = 111) metódou CMA (tab. 4). Metódou MLPA bolo z týchto ôsmi patogénnych variant zachytených päť variant (3,47 %, n = 144). Celkový záchyt patogénnych variant metódami MLPA a CMA vrátane konfirmačných vyšetrení patologického karyotypu je 14 (5,14 %) a 17 (6,25 %, n = 272) (tab. 5). Molekulárne cytogenetickým hodnotením vzoriek s fyziologickým karyotypom (alebo neúspešným chromozomálnym vyšetrením – zlyhanie kultivácie), boli spolu s patogénnymi variantami zachytené i varianty neznámeho významu (VOUS – variant of unknown significance) – metódou MLPA boli zachytené dve VOUS varianty u jednej vzorky a po jednej VOUS variante u piatich vzoriek (n = 144), metódou CMA u jednej vzorky štyri VOUS varianty a po jednej VOUS variante u siedmich vzoriek (n = 111). Z týchto zachytených variant, v troch prípadoch bola VOUS varianta zaznamenaná oboma metódami (podrobnejší zoznam záchytu VOUS variant u jednotlivých plodov tab. 6).

Diskusia

Najväčšiu diagnostickú výťažnosť vo vyšetřovanom súbore plodov mala me-

tóda CMA (tab. 5), čo potvrdzujú skúsenosti zaznamenané v dostupnej literatúre (tab. 7). Tieto výsledky len podporujú odporúčenie, používať techniku CMA ako prvotný testovací krok v prenatálnej diagnostike. Rozdiel medzi záchyтом metódou MLPA a metódou CMA tvoril 3,73 %. Pridaná hodnota metódy MLPA voči karyotypu je 3,47 % (n = 255) a u CMA je to 7,21 % (n = 255). Výhodou karyotypizácie je záchyt balansovaných zmien, ktorý v tomto súbore tvoril 1,08 % (n = 922).

Najväčší benefit priniesla analýza molekulárne cytogenetickými metódami v indikačnej skupine s mnohopočetnými vrodenými poruchami – 21,42 % v porovnaní so záchyтом izolovaných porúch 5,08 %. Na základe zistení z retrospektívnych analýz sa v 4,5–15 % prípadov zistila prítomnosť chromozómových abnormalít u izolovaných porúch [12,18,19] a 15–38 % prípadov s mnohopočetnými poruchami, zistenými ultrazvukovým vyšetřením [12,20–22].

Celkovo zachytených patogénnych variant metódami MLPA a CMA (MLPA – 144 plodov, CMA – 111 plodov) bolo osem (7,21 %, n = 111) a metódou MLPA bolo z týchto ôsmich patogénnych variant zachytených iba päť variant (3,47 %, n = 144).

Tab. 6. Podrobný súhrn výsledkov z analýzy molekulárne cytogenetickými technikami (MLPA, CMA) u plodov z fyziologickým karyotypom, za obdobie od roku 2015–2020. Zaznamenané sú varianty s nejasným významom, uvedené sú len OMIM gény.

Tab. 6. Detailed results summary analyzed by cytogenomics techniques (MLPA, CMA) in fetuses with normal karyotype, for the period 2015–2020. VOUS variants are listed and only OMIM genes are mentioned.

N	TT	Fenotyp	Materiál	Karyotyp	MLPA	Rozsah aberácie	CMA	OMIM gény
7.	13+0	pozitívny skrining v I. trimestri, NT 4,6	cvs	46,XY	rsa 7q35(CNTNAP2) × 1	0,792 Mb	arr [GRCh37]7q35 (146,079,235_146,872,072) × 1	CNTNAP2
9.	12+6	pozitívny skrining v I. trimestri, NT 5	cvs	46,XY	rsa 13q12.11 (MPHOSPH8,PSPC1, ZMYM2) × 3	0,832 Mb	arr[GRCh37]13q12.11 (19,972,233_20,804,712) × 3 pat	TPTE2, MPHOSPH8, PSPC1, ZMYM5, ZMYM2, GJA3, GJB2
10.	12+5	mnohopočetné vývojové poruchy *	cvs	46,XY	–	8,3 kb	arr[GRCh37]3q28 (189,363,665_189,371,964) × 1 mat	TP63
15.	13	pozitívny skrining v I. trimestri, VVP srdca v predchádzajúcej gravidite, NT 3,4	cvs	46,XY	rsa 17p13.3 (RPH3AL) × 3 mat	500 kb	–	RPH3AL
17.	13+1	pozitívny skrining v I. trimestri, NT 3,5	cvs	nevyšetrený – zlyhanie kultivácie	rsa 12p13.33(KDM5A) × 3 mat	–	–	KDM5A
26.	12+5	tachykardia, pozitívny skrining v I. trimestri, NT 2,2	cvs	46,XX – nízka kvalita metafázy	rsa 15q11.2 (TUBGCP5, NIPA1) × 1 mat	451,887 kb	arr[GRCh37]15q11.2 (22,765,628-23,217,514) × 1 mat	WHAMMP3, PDCD61-PP1, NIPA1, NIPA2, CYFIP1, TUBGCP5, ELMO2P1
						102,261 kb	arr[GRCh37]2q13 (110,862,477_110,964,737) × 3 pat	MALL, NPHP1
						42,421 kb	arr[GRCh37]7q36(147,970,857_148,013,277) × 1 pat	CNTNAP2
						170,515 kb	arr[GRCh37]21q22.11q22.12 (35,734,654_35,905,168) × 1 pat	KCNE2, SMIM11A, SMIM34A, FAM243A, KCNE1, RCAN1
29.	13+2	pozitívny skrining v I. trimestri, NT 2,6	cvs	nízky mitotický index (tri metafázy)	–	0,391 Mb	arr[GRCh37]Xq25 (127,050,472_127,441,794) × 0 mat	ACTRT1
30.	12+6 20+4	stenóza aorty, NT 1,8	pv	46,XY	–	0,284 Mb	arr[GRCh37]11q22.3 (102,983,567_103,268,313) × 1 mat	DYNC2H1
34.	13+4	pozitívny skrining v I. trimestri,	cvs	46,XY	–	0,581 Mb	arr[GRCh37]Xq21.32 (91,811,409_92,392,650) × 2	PCDH11X
36.	–	gemini monochooriales biamniales mortui gr. h. 35, plod B	tk	nevyšetrený – vzlyhanie kultivácie	rsa 19q13.43 (CHMP2A) × 1	–	–	CHMP2A
					rsa 20p13 (SOX12) × 1	–	–	SOX12
42.	13+2	pozitívni kombinovaný skrining v I. trimestri, NT 4,1	cvs	46,XX	–	93,174 kb	arr[GRCh37]2q13 (110,874,326_110,967,499) × 1	NPHP1, MALL

* nízko postavený ľavý ušný lalok, šijové presiaknutie (šírka 15 mm), patológia všetkých 4 končatín: bérec silne deformovaný a skrátený na 7 mm, noha výrazne hypoplastická – 4 prsty (ektrodaktýlia), v kolennom kĺbe flekčná kontraktúra, talus (členková kosť) v supinácii, NT 15 – analýza príslušnou metódou nebola vykonaná, CMA – mikročipová analýza, CVS – odber choriových kľkov, MLPA – Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, OMIM – Omin Mendelian Inheritance in Man, NT – nuchálna translucencia, PV – plodová voda, TK – tkanivo potrateného plodu, TT – týždeň tehotenstva

Tab. 7. Súhrn prenatalne detegovaných abnormalít metódami klasického cytogenetického hodnotenia a cytogenomickej analýzy (MLPA, CMA). Porovnanie s dostupnou literatúrou.

Tab. 7. Summary of prenatally detected abnormalities by methods of classical cytogenetic evaluation and cytogenomic analysis (MLPA, CMA). Comparison with available literature.

Literatúra	n	Karyotyp*	MLPA	CMA	
				patogénne	VOUS
Srebniak et al [26]	1 033	19 (1,84 %)	–	57 (5,5 %)	–
Chao et al [27]	1 510	47 (3,1 %)	–	61 (4 %)	66 (4,37 %)
Lou et al [28]	247		9 (3,6 %)	22 (8,9 %)	11 (4,45 %)
Wang et al [29]	5 003	188 (3,8 %)	–	50 (1 %)	85
Xia et al [30]	447	2 (0,4 %)	–	17 (3,8 %)	31 (6,9 %)
súčasná práca	922/144°/111~	10 (1,1 %)a	5 (3,47 %)°	8 (7,21 %)~	11 (4,31 %)°~

*nálezy aneuploidii a polyploidii neboli započítané, °SNP array (Illumina® San Diego, Kalifornia, USA), ° analýza metódou MLPA, ~ analýza metódou microarray, a karyotyp analyzovaný so súboru 922 vzoriek
CMA – mikročipová analýza, MLPA – Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, VOUS – varianty neznámeho významu

n = 144) a u 4,31 % (11/255) plodov varianty s nejasným významom, z celkového súboru 255 pacientov s už cytogeneticky overeným fyziologickým karyotypom. Tieto hodnoty sú konzistentné s nálezmi publikovanými v dostupnej literatúre, ktorej súhrn je v tab. 7. Z týchto štúdií je jasné, že technika CMA je vhodná na skrining celého genómu, vďaka čomu sa zvyšuje záchyt patologických CNV variant. Avšak aj napriek všetkým vyššie uvedeným zisteniam, má klasické cytogenetické hodnotenie karyotypu nenahraditeľné miesto v celom hodnotiacom procese. A to hlavne pre detekciu balansovaných prestavieb [23], mozaík [24] a polyploidii [25], ktoré sú cytogenomickými metódami (MLPA, CMA) náročne identifikovateľné a častokrát nezistiteľné.

Prínos a problematické hodnotenie VOUS variant

Významnou súčasťou výsledkov prenatalného testovania sú VOUS varianty. Detekcia týchto variant je častá u genetických testov, ktoré zahŕňajú podrobnejšiu a komplexnú analýzu genómu [31]. Aplikácia CMA u plodu sa súčasne stretáva s výhradami pre nálezy VOUS variant, ktoré sú práve v prenatalnej diagnostike problematické na klinickú interpretáciu. U niektorých variant, ktoré boli skôr hodnotené ako patogénne sa ukazuje,

že sa vyskytujú aj u zdravej populácie. Jedná sa o varianty, ktorých klinický dopad je veľmi variabilný a penetrancia neúplná. Často sú takéto varianty zdedené od zdravých rodičov. Jedným z príkladov je delécia v oblasti 15q11.2 zahŕňajúca 4 gény – *NIPA1*, *NIPA2*, *TUBGCP5*, *CYFIP1* – označovaná ako mikrodelečný syndróm (OMIM *615656 – Chromosome 15q11.2 deletion „syndrome“) [32,33]. Dopady tejto CNV nie sú jednoznačné a v súčasnosti sa odborná verejnosť prikláňa ku klasifikácii „vysoko frekventná varianta s nízkou penetranciou“ (high-frequency low-penetrant variant). Predpokladá sa však, že prítomnosť tejto delécie dopĺňa ďalšie genetické (model „second-hit“, polygénna dedičnosť) a environmentálne faktory [34,35]. Efekty takýchto delécií v oblasti 15q11.2 môžu smerovať k pochopeniu dôležitých biologických mechanizmov, ale ich veľkosť je príliš malá na to, aby samostatne mohli vypovedať o relevantnosti hodnotenia klinického dopadu u jednotlivca [36]. Rovnako sa to týka aj nálezu mikroduplikácie 16p11.2 [37], ktorá v tejto práci bola klasifikovaná ako patogénna varianta, ale v súvislosti s prenatalnou diagnostikou sa odborná verejnosť začína prikláňať ku klasifikácii VOUS varianty, práve z dôvodu neúplnej penetrancie tejto varianty, častokrát zdedenej od zdravého rodiča.

Záver

V tejto práci sa potvrdila vyššia úspešnosť záchytu patologických CNV variant metódou CMA než metódou MLPA. Metódou MLPA sa nezachytili tri patogénne varianty, ktoré však boli zachytené CMA. Firma MRC Holland síce ponúka probemixy, ktorými by tieto varianty boli zachytené, ale v čase prebiehajúcich analýz Ústav lekárskej genetiky týmito probemixami nedisponoval, keďže by bolo finančne a časovo veľmi náročné disponovať všetkými dostupnými probemixami. Táto metóda je na druhej strane vhodná na overovanie patologických nálezov zistených prostredníctvom CMA.

Cytogenetickým hodnotením karyotypu bolo zachytených 10 balansovaných aberácií (1,08 %), z ktorých však ani jedna nebola zachytená použitými cytogenomickými metódami, keďže je to limitujúci technologický faktor oboch metód (MLPA a CMA). Vynechaním konvenčnej cytogenetiky by tak uniklo až 1 % aberácií, vďaka ktorým bolo možné určiť riziko genetickej nestability v rodine a ďalšie kroky z toho vyplývajúce.

V neposlednom rade má CMA vyšší podiel záchytu VOUS variant, ktoré do značnej miery komplikujú klinickú interpretáciu. Avšak na druhej strane sú zdrojom nového poznania. V tejto práci sa cytogenomickými metódami celkom

tion. *Prenat Diagn* 2022; 42(10): 1281–1287. doi: 10.1002/pd.6149.

19. Meng X, Jiang L. Prenatal detection of chromosomal abnormalities and copy number variants in fetuses with congenital gastrointestinal obstruction. *BMC Pregnancy Childbirth* 2022; 22(1): 50. doi: 10.1186/s12884-022-04401-y.

20. Normand EA, Braxton A, Nassef S et al. Clinical exome sequencing for fetuses with ultrasound abnormalities and a suspected Mende-

29. Wang Y, Li Y, Chen Y et al. Systematic analysis of copy-number variations associated with early pregnancy loss. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2020; 55(1): 96–104. doi: 10.1002/uog.20412.
30. Xia M, Yang X, Fu J et al. Application of chromosome microarray analysis in prenatal diagnosis. *BMC Pregnancy Childbirth* 2020; 20(1): 696. doi: 10.1186/s12884-020-03368-y.
31. Westerfield L, Darilek S, van den Veyver IB. Counseling challenges with variants of uncertain significance and incidental findings in prenatal genetic screening and diagnosis. *J Clin Med* 2014; 3(3): 1018–1032. doi: 10.3390/jcm3031018.
32. von der Lippe C, Rustad C, Heimdal K et al. 15q11.2 microdeletion – seven new patients with delayed development and/or behavioural problems. *Eur J Med Genet* 2011; 54(3): 357–360. doi: 10.1016/j.ejmg.2010.12.008.
33. Burnside RD, Pasion R, Mikhail FM et al. Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. *Hum Genet* 2011; 130(4): 517–528. doi: 10.1007/s00439-011-0970-4.
34. Jønch AE, Douard E, Moreau C et al. 15q11.2 Working Group. Estimating the effect size of the 15Q11.2 BP1-BP2 deletion and its contribution to neurodevelopmental symptoms: recommendations for practice. *J Med Genet* 2019; 56(10): 701–710. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105879.
35. Maya I, Perlman S, Shohat M et al. Should we report 15q11.2 BP1-BP2 deletions and duplications in the prenatal setting? *J Clin Med* 2020; 9(8): 2602. doi: 10.3390/jcm9082602.
36. Štolfa M, Zůnová H, Slámová Z et al. „High-frequency low-penetrant variants“ Nový klasifikační stupeň pro hodnocení rekurentních variant genomu s vysokou frekvencí, ale nízkou penetrancí? Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky a genomiky ČLS JEP a 55. Výroční cytogenetické konference, Praha 2022.
37. Liu N, Li H, Li M et al. Prenatally diagnosed 16p11.2 copy number variations by SNP array: a retrospective case series. *Clin Chim Acta* 2023; 538: 15–21. doi: 10.1016/j.cca.2022.10.016.

ORCID autorov

A. Štefeková 0000-0003-4110-6680
P. Čapková 000-0002-5746-8670
V. Curtisová 000-0001-7829-2881
Z. Spurná 0000-0002-2533-0765
M. Procházka 0000-0002-9815-9401
R. Vrtěl 000-0002-2254-8099

Doručené/Submitted: 7. 3. 2023

Prijaté/Accepted: 20. 3. 2023

*Mgr. Andrea Štefeková
Ústav lékařské genetiky
LF UP a FN Olomouc
Zdravotníků 248/7
779 00 Olomouc
Andrea.Stefekova@fnol.cz*