Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

VYUŽITÍ FLUORESCENČNÍ POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE V ČASNÉ PRENATÁLNÍ DIAGNOSTICE ANEUPLOIDIÍ AUTOZOMŮ A HETEROCHROMOZOMŮ

RNDr. Martina Putzová
2008

Doktorské studijní programy v biomedicíně
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor, předseda oborové rady: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie, Doc.RNDr.Petr Pikálek,CSc.

Školicí pracoviště: Gennet, Ústav biologie a lék. genetiky

Autor: RNDr. Martina Putzová

Školitel: Prof. MUDr. Petr Goetz, CSc.

Školitel konsultant (byl – li): MUDr. David Stejskal

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

Obsah

1. Úvod 6

1.2. Prenatální diagnostika aneuploidií.....7
1.3. Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF-PCR).....7
2. Hypotézy a cíle práce.....9

3. Materiál a metodika 10

3.1. Biologický materiál.....10
3.2. Metodika.....10
3.3. Vlastní pracovní postup 10
4. Výsledky 12

5. Diskuze 14

6. Závěry 17

7. Použitá literatura.....18

8. Seznam publikací.....21

Souhrn

Dosažené výsledky potvrdily, že vyšetření metodou QF-PCR vykazuje 100% senzitivitu a při analýze 5 vyšetřovaných chromozomů je schopné identifikovat až 90% klinicky signifikantních chromozomálních aberací. Negativní výsledek QF-PCR analýzy snižuje reziduální riziko záchytu signifikantní chromozomální aberace nediagnostikovatelné QF-PCR u pacientek s negativním UTZ nálezem pod 1/1500. Tento fakt je velmi důležitý pro zmírnění obavy u pacientek s rizikem postižení plodu chromozomální aberací.

QF-PCR test zaměřený pouze na analýzu chromozomu 21 se ukázal jako ekonomická a klinicky akceptovatelná součást screeningu Downova syndromu v 2. trimestru. V případě striktního dodržení indikačních kritérií (pozitivní biochemický screening a UTZ provedený certifikovaným specialistou bez patologického nálezu) je schopen detekovat až 87,5% signifikantních chromozomálních aberací s kompletní specifitou.

Na základě zjištěné informativity použitých STR markerů v naší populaci se podařilo sestavit diagnostický set markerů s vysokou informativitou, včetně nadstavbových setů markerů na jednotlivé testované chromozomy, který minimalizuje riziko neinformativního výsledku vyšetření a umožňuje spolehlivou diagnostiku chromozomálních aberací testovaných chromozomů, včetně monozomie X, která byla při použití nedostatečného počtu markerů problematická.

Z dosažených výsledků vyplývá, že QF-PCR představuje vhodnou a spolehlivou molekulárně cytogenetickou metodu k rychlé diagnostice aneuploidií.

Conclusion

Achieved results confirmed that QF-PCR can provide rapid and reliable results in the majority of prenatal samples within 24 hours. Our results indicated that rapid aneuploidy detection (RAD) by QF-PCR method is ~90% sensitive and 100% specific, in accordance with published data. We were able to present results of the largest clinical application of QF-PCR in routine prenatal diagnosis in the Czech Republic.

A negative result from QF-PCR analysis, in conjunction with a negative US scan, shift the residual risk of significant foetal chromosomal aberation to under 1/1500, which may be an important factor in alleviating maternal anxiety.

RAD directed towards trisomy 21 only (our T21 test) is an economically and clinically acceptable component of second trimester screening for Down syndrome.

After evaluation of heterozygosity (and therefore, informativity) of commonly used STR markers, we were able to set up a new multiplex assay which significantly improved the QF-PCR methodology for rapid prenatal aneuploidy detection in the Czech population. Based on detected heterozygosity of markers used for QF-PCR in this population, new assay is a robust for the detection of chromosomes 13, 18, 21, X and Y in a single reaction.

1. Úvod

V této disertační práci byla využita specifická třída vysoce polymorfních markerů, tzv. krátkých repetitivních sekvencí (Short Tandem Repeats - "STR lokusy") k prenatální i postnatální diagnostice nejčastějších lidských aneuploidií metodou kvantitativní fluorescenční polymerázové řetězové reakce (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction - "QF-PCR").

STR lokusy jsou poměrně krátké, vysoce variabilní úseky DNA, které jsou v lidském genomu široce rozšířené. S použitím PCR (Polymerase Chain Reaction) jsou využitelné i v případě malého množství či částečně degradované DNA. Při běžných komparativních vyšetřeních v medicíně je možné srovnat zastoupení alel u testovaných jedinců (např. rodiče - dítě), při výpočtech příbuznosti či při individuální identifikaci jedince je nutné znát frekvence alel ve studovaných lokusech.

Nejčastější chromozomální aneuploidie zahrnují chromozomy 21, 18, 13 a pohlavní chromozomy. Tyto chromozomy jsou zodpovědné za více než 80 % chromozomálně podmíněných vývojových vad. Metoda QF-PCR umožňuje molekulární detekci aneuploidií jmenovaných chromozomů. Tato metoda zároveň umožňuje zjištění rodičovského původu nadbytečného chromozomu a určení, zda k procesu nondisjunkce došlo v první či druhé meióze, popřípadě v mitóze.

Vyšší věk matky je nejzávažnějším faktorem etiologie Downova syndromu. V menší míře toto platí i pro ostatní trizomie.

Za možnou příčinu nondisjunkce se považuje také radioaktivní záření. Po roce 1986, kdy došlo k výbuchu jaderné elektrárny v Čemobylu, bylo publikováno především v západní a střední Evropě velké množství populačních studií, které se zabývaly vlivem radiačního záření na zdravotní stav takto exponované populace. Výsledky studií se však spíše přiklánějí k dlouhodobému trendu nárůstu incidence Downova syndromu v populaci v důsledku vyššího věku rodiček a s jinými negativně působícími faktory prostředí. K podobným závěrům došla i studie celkem 124 nukleárních rodin dětí postižených Downovým syndromem narozeným po roce 1987 z Ruska, Ukrainy a Berlína, na které autorka participovala. Výsledky byly publikovány v Machatková et al. 2005 (P3).

1.2. Prenatální diagnostika aneuploidií

Prenatální diagnostika chromozomálních aneuploidií bývá ve většině případů prováděna klasickou cytogenetickou analýzou kultivovaných buněk získaných z plodové vody nebo choriových klků. Tento postup vyžaduje dlouhodobou kultivaci fetálních buněk a výsledek vyšetření je ve většině případů k dispozici až 12 - 15 dnů po odběru biologického materiálu. Cytogenetická analýza umožňuje detekci všech chromozomálních aberací, její hlavní nevýhodou je časová náročnost vyšetření. Interval mezi odběrem vzorku a vydáním výsledku zvyšuje anxiozitu budoucích rodičů, hlavně v případech, kdy neinvazivní screeningové testy (biochemické testy a/nebo ultrazvukové vyšetření plodu) provedené během prvního a druhého trimestru těhotenství naznačují zvýšené riziko chromozomální aberace (Marteau *et al.* 1992).

Většina patologických nálezů identifikovaných v prenatálních vzorcích zahrnují trizomie chromozomů 13, 18 a 21 a aneuploidie pohlavních chromozomů X a Y. (Crandall *et al*. 1980; Ferguson-Smith *et al*. 1984). Včasná identifikace těchto chromozomálních aberací je velmi významná pro klinický management patologických těhotenství. V minulých letech bylo proto zavedeno mnoho nových metod molekulární cytogenetiky, které umožňují jejich identifikaci do 24-48 hodin po odběru vzorku.

Velice rychlou alternativní metodou molekulární cytogenetiky je metoda QF-PCR. Vyšetření je možné provést do jednoho dne po odběru biologického materiálu a patří k nejperspektivnějším metodám prenatální cytogenetické diagnostiky (Ferguson-Smith 1997).

1.3. Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF-PCR)

QF-PCR je molekulárně genetická metoda, která umožňuje rychlou diagnostiku nejčastějších aneuploidií. Principem metody je PCR amplifikace vybraných STR lokusů; tyto lokusy jsou vysoce polymorfní, v průběhu života jedince velmi stabilní a mohou po PCR amplifikaci sloužit jako markery pro detekci vybraných chromozomálních aneuploidií (Adinolfi *et al*. 1997, Mansfield 1993, Sherlock *et al*. 1998, Tóth *et al*. 1998, Pertl *et al*. 1994, 1996, 1997, 1999a, 1999b, Cirigliano *et al*. 2001, 2004, 2006). Tato metoda umožňuje nejen detekci aneuploidií, ale zároveň umožňuje velmi přesně určit parentální původ nadbytečného chromozomu a lokalizovat vznik nondisjunkce do prvního či druhého meiotického dělení.

Do současné doby bylo nalezeno velké množství polymorfních STR markerů. Pravděpodobnost informativního výsledku je dána výší heterozygozity konkrétního markeru. Heterozygozita (a tudíž informativita) se stejně jako frekvence jednotlivých alel v jednotlivých studovaných populacích liší (Sacchetti et al. 1999).

Výběr STR markerů pro analýzu je proto velice důležitý. Pokud je selekce použitých markerů založena na skutečných heterozygozitách v analyzované populaci, umožní tento přístup minimalizovat riziko nedostatečně informativního výsledku.

Metoda QF-PCR využívá převážně tetranukleotidové STR markery, které jsou stabilní při amplifikaci metodou PCR. Při jejich amplifikaci nedochází k tak časté tvorbě "stutterů" vlivem sklouzávání DNA polymerázy ani k tak výrazné preferenční amplifikaci kratších alel jako je tomu u dříve hojně používaných dinukleotidových markerů (Utah Marker Development Group, 1995).

Výhody použití QF-PCR jako doplňujícího vyšetření ke klasickému cytogenetickému vyšetření dokumentuje mnoho publikací (Adinolfi et al. 1995, Pertl et al. 1996, 1997, 1998, 1999a, Findlay et al. 1998, Valero el al. 1999, Schmidt et al. 2000, Putzova *et al*. 2008).

2. Hypotézy a cíle práce

Cílem předkládané disertační práce bylo zkvalitnit, rozšířit a standardizovat diagnostiku aneuploidií chromozomů 13, 18, 21, X a Y metodou QF-PCR a její aplikace v klinické praxi. Pro standardizaci metody bylo nutné především zavedení nových STR markerů s vysokou heterozygozitou (a tudíž informativitou).

Pracovní hypotézy:

(1) Ověření senzitivity a specificity QF-PCR vyšetření aneuploidií chromozomů 13, 18, 21, X a Y na velkém množství klinických vzorků.

(2) Ověření možnosti analýzy pouze trizomie chromozomu 21 v případech indikovaných výhradně na základě pozitivního biochemického screeningu v druhém trimestru těhotenství (ověření senzitivity, specificity a kalkulace reziduálního rizika dalších chromozomálních aberací).

(3) Kalkulace reziduálního rizika jiné chromozomální aberace ve vyšetřovaném souboru klinických vzorků.

(3) Do jaké míry by ovlivnilo informativitu vyšetření, pokud by se podařilo sestavit diagnostický set z STR markerů vybraných na základě skutečně zjištěných heterozygozit v české populaci.

3. Materiál a metodika

3.1. Biologický materiál

Soubor zpracovaný v rámci prenatálního a postnatálního vyšetření tvořilo více než 7 200 vzorků. Všechny vzorky, indikované k vyšetření metodou QF-PCR byly indikovány současně na klasické cytogenetické vyšetření karyotypu (duální testování). Výsledky vyšetření metodou QF-PCR byly nicméně uzavřeny bez znalosti výsledků cytogenetického vyšetření.

3.2. Metodika

V období od listopadu 2002 do února 2007 bylo k vyšetření nejčastějších aneuploidií metodou QF-PCR indikováno celkem 6349 vzorků – soubor sestával z 142 vzorků choriových klků a 6207 vzorků plodové vody. Vyšetření bylo ve všech případech provedeno jako rychlé doplňkové vyšetření vybraných nejčastějších aneuploidií za současné cytogenetické analýzy celého karyotypu. U 2764 vzorků (44.5%) byla provedena analýza chromozomů 13, 18, 21, X a Y. Indikační kritéria tohoto vyšetření byla následující:

(1) pozitivní ultrasonografický nález

(2) riziko trizomie chromozomu 18 zjištěné na základě biochemických testů

(3) pozdní záchyt suspektně patologického těhotenství

(4) anxiozita matky

V 3443 případech bylo provedeno pouze vyšetření chromozomu 21 (55.5%). Test byl indikován na základě rizika trizomie chromozomu 21 vyššího než 1:250 stanoveného výhradně biochemickými testy v druhém trimestru těhotenství s negativním ultrasonografickým nálezem.

3.3. Vlastní pracovní postup

Izolace DNA z nativní plodové vody i choriových klků byla prováděna komerčně dodávaným kitem Qiagen (Qiagen, USA) za použití standardních izolačních protokolů

s modifikacemi pracovního postupu (popsáno v Putzova *et al.* 2008 (P1)). Pokud byla k analýze dodána krev (fetální krev popř. periferní krev matky pro srovnávací analýzu) DNA izolována pomocí kitu Qiagen (Qiagen, USA) nebo za použití izolačního přístroje MagNA Pure Compact (Roche, Switzerland).

Od roku 2002 došlo několikrát ke změně kompozice vyšetřovacích markerů pro vyšetření aneuploidií chromozomů 13, 18, 21, X a Y za účelem zvýšení efektivity vyšetření. V letech 2002 až 2004 byly používány markery popsané v publikaci Pertlové et al. 1997. Markery X22, P39 a amelogeninový marker (X-106 bp/Y-112bp) byly doplněny na počátku roku 2003 pro přesnější stanovení aneuploidií pohlavních chromozomů (Cirigliano et al. 1999). Od roku 2004 byly k vyšetření používány dva multiplexní sety: multiplex popsaný Mann et al. 2004 obsahující 13 markerů specifických pro chromozomy 13, 18 a 21 a set k vyšetření aneuploidií pohlavních chromozomů popsaný Donaghue et al. 2003. Změny do roku 2007 byly popsány v Putzová et al. 2008. (P1)

Od února 2007 je aplikován nově sestavený diagnostický set markerů. Postup sestavení setu a výsledky jeho aplikace popsány v Putzova et al. in press (P2). STR markery byly vybrány (1) na základě skutečně zjištěných heterozygozit v naší populaci (2) na základě jejich umístění na testovaných chromozomech (3) preferovány byly STR markery s nízkou frekvencí zjištěných mikroduplikací v naší populaci. Soubor STR markerů k vyšetření trizomie chromozomu 21 v letech 2002 až 2007 sestával z markerů D21S1432, D21S1446, D21S11, D21S1411 a AMX/Y (Putzová et al. 2008 (P1)). V roce 2007 byl tento set rovněž modifikován, byly doplněny markery D21S1435, D21S1437 a D21S1412 a z analýzy byl vypuštěn marker D21S1446.

4. Výsledky

V letech 2002 až 2007 byly vzorky testovány pomocí dříve publikovaných setů STR markerů (Donaghue *et al.* 2003, Mann *et al.* 2004, Pertl *et al.* 1997) a setu k detekci trizomie 21 na souboru 6 349 klinických vzorků. Výsledky aplikace těchto multiplexních setů STR markerů jsme publikovali v Putzová *et al*. 2008 (P1). Všechny vzorky v tomto souboru byly duálně testovány.

Soubor byl rozdělen na základě indikace k vyšetření do dvou kategorií:

1) vzorky testované na CHAs 13, 18, 21, X a Y obsahoval 2 906 vzorků (všechny CVS (142) a 2764 PV) s následujícími indikačními kritérii: 1) pozitivní UTZ, 2) zvýšené riziko trizomie chr. 18 zjištěné na základě biochemického testu, 3) pokročilý TT při vyžádání vyšetření, 4) anxiozita matky

2) vzorky testované na pouze markery specifickými pro chromozom 21 – celkem 3443 PV. Jediným indikačním kriteriem byl pozitivní výsledek biochemického screeningu (≥1:250) s negativním UTZ nálezem.

Všechny pozitivně testované vzorky (celkem 242) byly rozděleny do čtyř kategorií: 1) chromozomální aberace diagnostikovatelné RAD, 2) nebalancované chromozomální aberace (CHA) a trizomie autozomů nediagnostikovatelné RAD, 3) CHAs s nejasnou prognózou (balancované *de novo*, mozaikové formy a marker chromozomy), 4) ostatní CHAs, pravděpodobně bez klinického významu v probíhající graviditě (familiární balancované přestavby a polymorfismy). Abnormální nálezy a frekvence jejich nálezu v našem souboru je shrnuta v tabulce 1.

QF-PCR test, testující chromozomy 13, 18, 21, X a Y detekoval 91,5% CHAs (130/142) signifikantních CHAs v souboru 2906 testovaných vzorků. V kategorii testované pouze na trizomii chromozomu 21 bylo zachyceno 87,5% (42/48) signifikantních CHAs. Detailní klinické informace o všech klinicky signifikantních CHAs nedetekovaných metodou QF-PCR v tomto souboru byl publikován v Putzova et al. 2008 (P1).

Tabulka 1: Abnormální cytogenetické nálezy duálně testovaných vzorků (n=6349) a frekvence jejich výskytu v testovaném souboru

Cytogenetická kategorie	Počet	Část (%)	Frekvence nálezu (1 pozitivní nález na počet testovaných vzorků)
CHA diagnostikovatelné QF-PCR	**175**	**72.3**	**1 : 36**
Všechny CHA nediagnostikovatelné RAD	**67**	**27.7**	**1 : 90**
Nebalancované	10	4.1	1 : 600
Nejistá prognóza	12	5.0	1 : 500
Bez klinického významu v probíhající graviditě	45	18.6	1 : 140
CELKEM	**242**	**100**	

Na základě těchto výsledků byla také stanovena heterozygozita jednotlivých použitých STR markerů a sestaven nový diagnostický set STR markerů tak, aby bylo sníženo na minimum riziko neinformativního výsledku. Tento diagnostický set je v naší laboratoři (Gennet, Praha) aplikován od února 2007. Informace o vybraných STR markerech použitých v novém diagnostickém setu, metodika sestavení setu a první výsledky získané na 960 klinických vzorcích budou publikovány zanedlouho (Putzova et al. Prenat Diagn, in press, P2).

Současně byla vytvořena soustava nadstavbových markerů vhodných k samostatnému testování jednotlivých chromozomů. Tyto sety jsou využívány (1) k samostatnému testování jednotlivých chromozomů v případě potřeby ověření patologického výsledku zjištěného základním setem STR markerů; (2) k samostatnému testování jednotlivých chromozomů v případě nedostatečně informativního výsledku konkrétního chromozomu po vyšetření základním setem STR markerů. Nadstavbové sety byly konstruovány tak, že obsahují všechny STR markery na testovaný chromozom obsažené v základním setu a 4-7 vybraných nadstavbových markerů.

5. Diskuze

Tato disertační práce je věnována problematice vyšetřovací metody QF-PCR, její optimalizaci, standardizaci a možnostem jejího využití v prenatální a postnatální diagnostice nejčastějších aneuploidií.

V úvodní části práce byly testovány dříve publikované multiplexní sety STR markerů na velkém množství klinických vzorků. Vzhledem k faktu, že metoda QF-PCR se v ČR neprovádí jako samostatné vyšetření, ale je ve všech indikovaných případech součástí duálního testování karyotypu plodu v riziku chromozomální aberace, testovali jsme možnost vyšetřovat v přísně indikovaných případech pouze chromozom 21 (zvýšené riziko Downova syndromu zjištěné na nákladě výsledků druhotrimestrálního biochemického screeningu s negativním UTZ nálezem). Výsledky tohoto přístupu jsme publikovali v European Journal of Medical Genetics (P1).

V druhé části disertační práce byla řešena možnost optimalizace a rozšíření spektra vyšetřovacích markerů tak, aby byla zvýšena informativita a tím i efektivita vyšetření. Vycházeli jsme z faktu, že informativita (heterozygozita) jednotlivých STR markerů se v jednotlivých populacích může více či méně lišit (Sacchetti 1999), při sestavování nového diagnostického setu jsme tedy vycházeli z heterozygozit skutečně zjištěných v české populaci na celkem 2 906 prenatálně testovaných vzorcích. Námi zjištěné informativity jednotlivých testovaných STR markerů a postup při výběru markerů do nového multiplexního setu byl popsán a bude zanedlouho publikován v Pranatal Diagnosis (P2). Nad rámec tohoto publikovaného setu byl vytvořen komplex nadstavbových STR markerů, které jsou používány k ověření patologického výsledku zjištěného základním setem STR markerů a ve výjmečných případech (cca 0,3% všech testovaných vzorků) k doplnění vyšetření v případě, že byl na některém z vyšetřovaných chromozomů získán informativní výsledek pouze na jediném STR markeru.

Výsledky studie potvrzují, že pro amplifikaci metodou QF-PCR by měly být použity výhradně tetranukleotidové či pentanukleotidové markery. Jsou stabilnější a při jejich amplifikaci nedochází ke sklouzávání DNA polymerázy tak jako je tomu u dinukleotidových markerů (Utah Marker Development Group, 1995).

Zároveň byly zavedeny markery sloužící k spolehlivé detekci všech aneuploidií pohlavních chromozomů. Dříve doporučená kombinace markerů AMX/Y, X22, P39 a

XHPRT (Cigriliano et al. 1999, Sherlock et al. 1998) se ukázala jako zcela nedostatečná (viz. Putzová et al. 2008 (P1)), kdy řada normálních ženských plodů (až 0,5%) vykazovala monoalelický nález na všech třech markerech. Okamžitě po tomto zjištění byl zaveden set publikovaný Donaghue et al. 2003. Námi nově sestavený set diagnostických markerů obsahuje dostatečný počet STR markerů specifických k chromozomům X a Y a umožňuje detekci všech variant aneuploidií pohlavních chromozomů, včetně 47, XYY, 47,XXX, 47,XXY a izochromozomu X, které pomocí setů užívaných před rokem 2002 nebylo možné detekovat.

Dosažené výsledky potvrdily, že vyšetření metodou QF-PCR vykazuje 100% senzitivitu a při analýze 5 vyšetřovaných chromozomů je schopné identifikovat až 90% klinicky signifikantních chromozomálních aberací (Putzová et al. 2008 (P1)). Při analýze pouze chromozomu 21 je možné v případě striktního dodržení indikačních kritérií (pozitivní biochemický screening a UTZ provedený certifikovaným specialistou bez patologického nálezu) detekovat až 87,5% signifikantních chromozomálních aberací s kompletní specifitou a je tedy akceptovatelnou levnější variantou běžně prováděné QF-PCR, v případě, že je tato analýza prováděna v rámci duálního testování PV (Putzová et al. 2008 (P1)).

V literatuře se již dlouho diskutuje o možnosti, že by QF-PCR pomohlo redukovat potřebu konvenční cytogenetické analýzy pouze na přísně indikované případy. Retrospektivní analýzy (Chitty et al. 2006, Kagan et al. 2007) naznačují, že indikací, která by měla mít největší váhu při rozhodování o tom, zda by QF-PCR mělo být doplněno o cytogenetické vyšetření celého karyotypu je UTZ vyšetření plodu. V případě patologického UTZ nálezu by měla být karyotypyzace provedena. UK je zatím jediná země, kde je QF-PCR aplikováno na všechny invazivně testované vzorky jako samostatně indikované vyšetření a pouze u pacientek s patologickým ultrazvukovým nálezem je doplněno vyšetření karyotypu. Hlavním důvodem je úspora finančních prostředků U.K. National Health Service. Karyotypizace je prováděna jen u cca 15% všech invazivně odebraných vzorků a riziko falešně negativního výsledku je u těhotenství bez UTZ nálezu pouze 1 na přibližně 1 500 provedených QF-PCR vyšetření (Grimshaw et al. 2003, Ogilvie et al. 2005b).

Na základě retrospektivní analýzy našich dat z let 2002-2007 jsme došli k podobným výsledkům. Riziko falešně negativního výsledku v našem souboru by při testování chromozomů 13, 18, 21, X a Y pouze metodou QF-PCR u těhotenství s negativním UTZ nálezem bylo 1 : 1 513 provedených vyšetření (Putzova et al. 2008 (P1)). To by však přinášelo riziko přibližně třech falešně negativních výsledků při průměrném ročním počtu

4 000 prenatálních vyšetření v našem centru. Z tohoto důvodu QF-PCR zůstává doplňkovou metodou u vysoce rizikových těhotenství, po jejímž provedení s negativním výsledkem zůstává reziduální riziko falešně negativního výsledku nízké a tato skutečnost pomáhá snížit psychickou zátěž u anxiozních pacientek, naopak pozitivní nález při korespondujícím UTZ nálezu umožňuje okamžitý management patologických těhotenství.

Z dosažených výsledků vyplývá, že QF-PCR představuje vhodnou molekulárně cytogenetickou metodu k rychlé diagnostice aneuploidií. Výsledky diagnostiky metodou QF-PCR je možné získat již do několika hodin po odběru biologického materiálu, a proto je výhodná pro řešení akutních geneticky rizikových případů. Vyšetření metodou QF-PCR je v ČR aplikováno jako součást duálního testování karyotypu, kdy je používáno především u pacientek s vysokým rizikem chromozomální aberace (≥1:100), hlavně v případech, kdy je vhodný rychlý management rizikové gravidity (pozitivní UTZ nález, pozdní záchyt patologické gravidity).

6. Závěry

Předložené výsledky představují největší klinickou aplikaci rychlé prenatální diagnostiky aneuploidií v České republice. Z dosažených výsledků vyplývá, že QF-PCR představuje vhodnou molekulárně cytogenetickou metodu k rychlé diagnostice aneuploidií. Výsledky diagnostiky metodou QF-PCR je možné získat již do několika hodin po odběru biologického materiálu, a proto je výhodná pro řešení akutních geneticky rizikových případů. Vyšetření metodou QF-PCR je v ČR aplikováno jako součást duálního testování karyotypu, kdy je používáno především u pacientek s vysokým rizikem chromozomální aberace (≥1:100), hlavně v případech, kdy je vhodný rychlý management rizikové gravidity (pozitivní UTZ nález, pozdní záchyt patologické gravidity).

Zavedením nového diagnostického setu sestaveného na základě zjištěných informativit používaných markerů v české populaci se podařilo zrychlit a zkvalitnit prenatální diagnostiku minimalizací rizika získání neinformativního výsledku vyšetření.

7. Použitá literatura

1. A collection of ordered tetranucleotide-repeat markers from the human genome. The Utah Marker Development Group.1995. Am J Hum Genet 57:619-628.

2. Adinolfi M., Pertl B., Sherlock J. 1997. Rapid detection of aneuploidies by microsatellites and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. Prenat Diagn 17: 1299-1311.

3. Adinolfi M., Sherlock J., Pertl B. 1995. Rapid detection of selected aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. Bioessays 17: 661-664.

4. Caine A, Maltby AE, Parkin CA, Waters JJ, Crolla JA, UK Association of clinical Cytogeneticists (ACC). 2005. Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment, The Lancet, 366 (9480): 123-128.
5. Cirigliano V., Lewin P., Szpiro-Tapies S., Fuster C. & Adinolfi M. 2001a. Assessment of new markers for the rapid prenatal detection of aneuploidies by quantitative fluorescent PCR (QF-PCR). *Ann. Hum. Genet.* 65: 421-7
6. Cirigliano V., Ejarque M., Canadas M.P., Lloveras E., Plaja A., Perez M.M., Fuster C.& Egozcue J. 2001b. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. *Mol. Hum. Repr.* 7:1001-6
7. Cirigliano V., Sherlock J., Conway G., Quilter C., Rodeck Ch., Adinolfi M. 1999. Rapid detection of Chromosomes X and Y Aneuploidies by Quantitative Fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 19: 1099-1103.
8. Cirigliano V, Voglino G, Cañadas P, Marongiu A, Ejarque M, Ordoñez E, Plaja A, Massorbrio M, Todros T, Fuster C, Campogrande M, Egozcue J, Adinolfi M. 2004. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18.000 consecutive clinical samples, Mol. Hum. Reprod. 10: 839–846.
9. Cirigliano V, Voglino G, Marongiu A, Cañadas P, Ordoñez E, Lloveras P, Plaja A, Fuster C, Adinolfi M. 2006. Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR: evaluation of 30,000 consecutive clinical samples and future aplications, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1075: 288–298.
10. Crandall BF, Lebherz TB, Rubinstein L, Robertson RD, Sample WF, Sarti D, Howard J. 1980. Chromosome findings in 2,500 second trimester amniocenteses. *Am J Med Genet* 5: 345-56
11. Donaghue C, Roberts A, Mann K, Ogilvie CM. 2003. Development and targeted application of a rapid QF-PCR test for sex chromosome imbalance, Prenat. Diagn. 23(3): 201–210.

12. Ferguson-Smith M.A. 1997. Diagnosis for management and Treatement. *Prenat Diagn* 17:1201-1206.
13. Ferguson-Smith MA, Yates JR. 1984. Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative european study on 52 965 amniocenteses. *Prenat Diagn* 4: 5-44

14. Findlay L, Matthews P., Quirke P. 1998. Multiple genetic diagnoses from single cells using multiplex PCR: reliability and allele dropout. *Prenat Diagn* 18: 1413-1421.

15. Grimshaw GM, Szczepura A, Hulten M, MacDonald F, Nevin NC, Sutton F, Dhanjal S. (2003) Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. Health Technol Assess 7:1– 146
16. Chitty LS, Kagan KO, Molina FS, Waters JJ, Nicolaides KH. 2006. Fetal nuchal translucency scan and early prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities by rapid aneuploidy screening: observational study, BMJ 332 (7539)452-455.
17. Kagan KO, Chitty LS, Cicero S, Eleftheriades M, Nicolaides KH. 2007. Ultrasound findings before amniocentesis in selecting the method of analysing the sample, Prenatal Diagn 27 (1): 34-39.
18. Machatkova M, Brouckova M, Matejckova M, Krebsova A, Sperling K, Vorsanova S, Kutsev S, Zerova T, Arbuzova S, Krejci R, Petersen M, Macek M Sr. 2005.QF-PCR examination of parental and meiotic origin of trisomy 21 in Central and Eastern Europe. J Histochem Cytochem. Mar;53(3):371-3
19. Mann K, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Ogilvie CM. 2004. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy, European Journal of Human Genetics 12: 907-915.
20. Mansfield E.S. 1993. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative fluorescent polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet* 2: 43-50.
21. Marteau T.M. 1992. Screening, ethics and the law. BMJ. 1992 Dec 5; 305(6866):1433-4.
22. Ogilvie CM, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Mann K. 2005a. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy using quantitative fluorescence-PCR (QF-PCR). J. Histochem. Cytochem. 53(3):285-8.
23. Ogilvie CM, Lashwood A, Chitty L, Waters JJ, Scriven PN, Flinter F. 2005b. The future of prenatal diagnosis: rapid testing or full karyotype? An audit of chromosome abnormalities and pregnancy outcomes for women referred for Down's Syndrome testing. BJOG 112 (10):1369-1375.
24. Pertl B., Adinolfi M. 1998. Diagnosis of chromosomal aneuploidies using quantitative fluorescent PCR. Lo, Y. M. D. Methods in molecular medicine: clinical applications of PCR (16), 287-299. Totowa, New Jersey, Humana Press.
25. Pertl B., Kopp S., Kroisel P.M., Hausler M., Sherlock J., Winter R., Adinolfi M. 1997. Quantitative fluorescent PCR for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex. *Am J Obs Gyn* 177: 899-906.
26. Pertl B., Kopp S., Kroisel P.M., Tului L., Brambati B., Adinolfi M. 1999a. Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescent PCR: First aplication on 247 chorionic villus samples. *J Med Genet* 36: 300-303.
27. Pertl B., Pieber D., Lercher-Hart1ieb A., Orescovic I., Haeusler M., Winter R., Kroisel P., Adinolfi M. 1999b. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders. *Mol Hum Reprod* 5: 1176-1179.
28. Pertl B., Sekizawa A., Samura O., Orescovic I., Rahaim P.T., Bianchi B.W. 2000. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum Genet* 106: 45-49.
29. Pertl B., Yau S.C., Sherlock J., Davies A.F., Mathew C.G., Adinolfi M. 1994 Rapid molecular method for prenatal detection of Down syndrome. *Lancet* 343: 1197-1198.

30. Pertl B., Weitgasser U., Kopp S., Kroisel P.M., Sherlock. J., Adinolfi M. 1996. Rapid detection of trisomy 21, 18 and sexing with quantitative fluorescent multiplex PCR. *Hum Genet* 98: 55-59.
31. Putzova M, Soldatova I, Pecnova L, Dvorakova L, Goetz P, Stejskal D. 2008. QF-PCR - based prenatal detection of common aneuploidies in the Czech population: five years of experience, European Journal of Human Genetics 51: 209-218.
32. Putzova M, Pecnova L, Dvorakova L, Soldatova I, Goetz P, Stejskal D. OmniPlex – a new QF-PCR assay for prenatal diagnosis of common aneuploidies based on evaluation of the heterozygosity of short tandem repeat loci in the Czech population. Prenatal Diagnosis, In press.
33. Sacchetti L, Calcagno G, Coto I, Tinto N, Vuttariello E, Salvatore F. 1999. Efficiency of two different nine-loci short tandem repeat systems for DNA typing purposes, Clin Chem. 45(2): 178-183.
34. Sherlock J., Cirigliano V., Petrou M., Tutschek B., Adinolfi M. 1998. Assessment of Quantitative Fluoresent Multiplex PCR performed on single cells. *Annals Hum Gen* 62(1): 9-23.
35. Schmidt W., Jenderny J., Hecher K., Hackelöer B.-J., Kerber S., Kochhan L., Held K.R. 2000. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. *Mol Hum Reprod* 6(9):855-860.
36. Toth T., Findlay I., Papp C., Tóth-Pál E., Marton T., Nagy B., Quirke P., Papp Z. 1998. Prenatal detection of trisomy 21 and 18 from amniotic fluid by quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *J Med Genet* 35: 126-129.
37. Valero R, Marfany G, Gil-Benso R, Ibáñez MA, López-Pajares I, Prieto F, Rullan G, Sarret E, Gonzàlez-Duarte R. 1999. Molecular characterisation of partial chromosome 21 aneuploidies by fluorescent PCR. J Med Genet. Sep: 36(9):694-9

8. Seznam publikací

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) publikace s IF

Putzova M, Pecnova L, Dvorakova L, Soldatova I, Goetz P, Stejskal D. OmniPlex – a new QF-PCR assay for prenatal diagnosis of common aneuploidies based on evaluation of the heterozygosity of short tandem repeat loci in the Czech population. **Prenatal Diagnosis**, In press. **IF: 1.885**

Putzova M, Soldatova I, Pecnova L, Dvorakova L, Goetz P, Stejskal D. 2008. QF-PCR - based prenatal detection of common aneuploidies in the Czech population: five years of experience. **European Journal of Medical Genetics** 51: 209-218. **IF: 1.857**

Machatkova M, Brouckova M, Matejckova M, Krebsova A, Sperling K, Vorsanova S, Kutsev S, Zerova T, Arbuzova S, Krejci R, Petersen M, Macek M Sr. 2005.QF-PCR examination of parental and meiotic origin of trisomy 21 in Central and Eastern Europe. **J Histochem Cytochem.** Mar;53(3):371-3. **IF: 2.675**

b) publikace bez IF

Macek M Sr, Krebsova A, Brouckova M, Matejckova M, Machatkova M, Diblik J, Sperling K, et al. (2003) Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QFPCR) in the prenatal and postnatal diagnosis of the most frequent aneuploidies. Balkan J Med Gen 6:87–94

Macek M. Sr, Krebsova A, Horka I, Diblik J, Matejckova M, Brouckova M, Chudoba D, et al. (2002) Quantitative fluorescent PCR (QFPCR) in the examination of microquantity of fetal cell. In Macek M Sr, Bianchi DW, Cuckle H, eds. Early Prenatal Diagnosis, Fetal Cells and DNA in the Mother, Present State and Perspectives. Prague, The Karolinum Press, 304–328

M. Macek, A. Krebsová, I. Horká, M. Matějčková, M. Broučková, J .Diblík, I. Hromadníková, D. Chudoba, D. Novotná, M. Havlovicová, E. Kulovaný: Quantitative

fluorescent PCR (QFPCR) in the examination of microquantity of fetal cells. Monography, Charles University Press, Karger, 2002

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu dizertace

Putzová M., Pecnová L., Hulvert J., Vykysalá L., Landfeld M., Míka J., Potužníková P., Brandejská M., Stejskal D. Preimplantační genetická diagnostika monogenně podmíněných chorob – její možnosti, úskalí a první úspěchy v České republice. Česko-slovenská Pediatrie, 63 (11):626-633.