



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

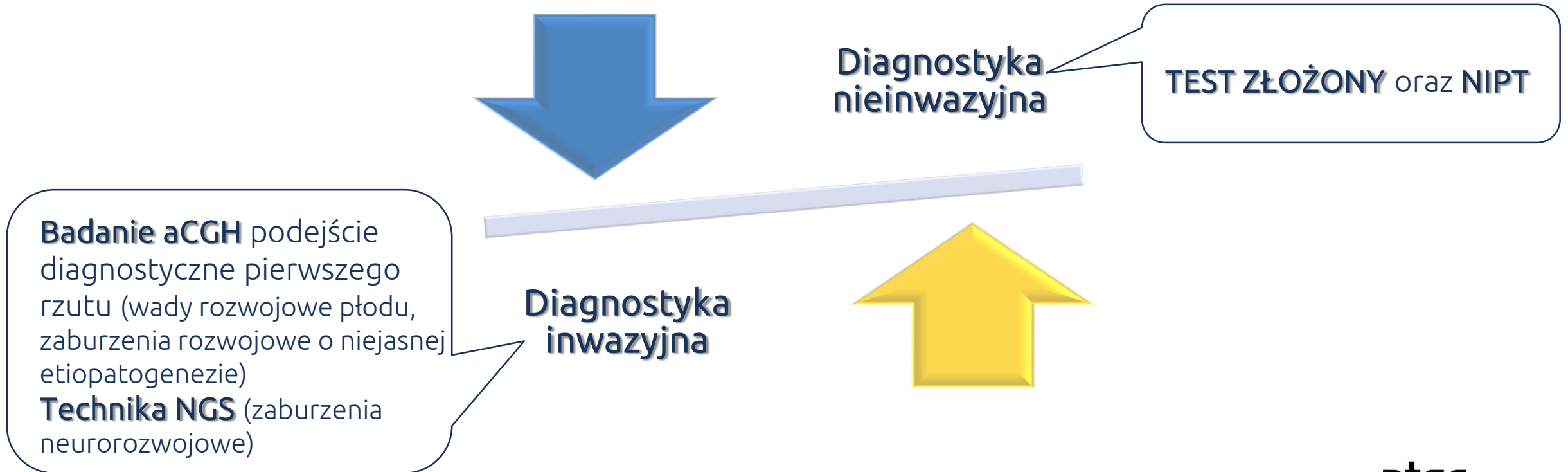
Diagnostyka inwazyjna - możliwości i ograniczenia

Przegląd obecnie dostępnych metod.

Co warto wybrać, kiedy i dlaczego?

dr n med. Anna Madetko-Talowska
Zakład Genetyki Medycznej UJCM

Diagnostyka prenatalna

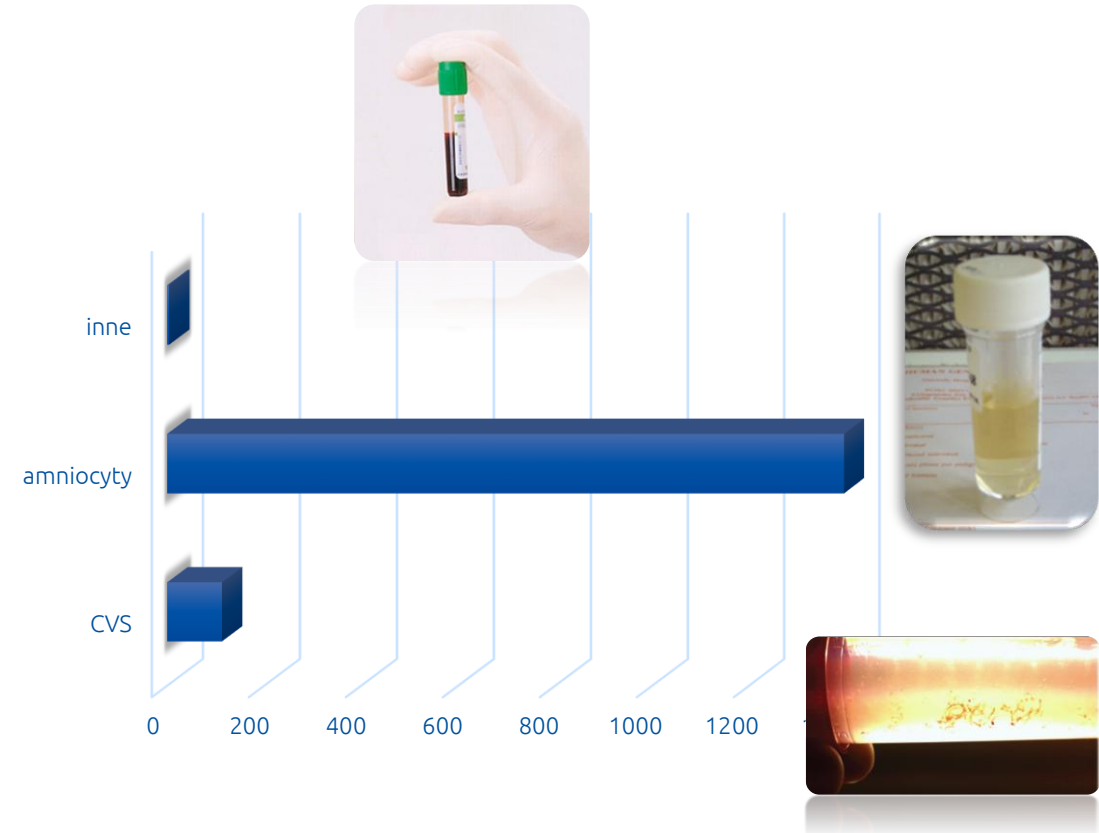
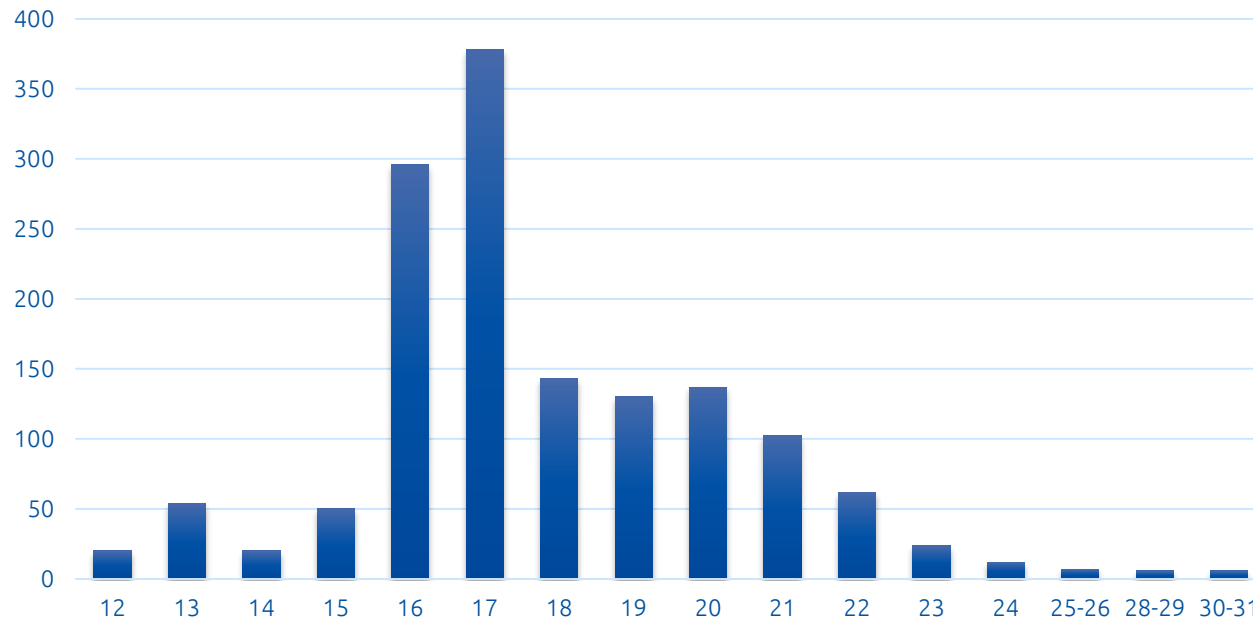


REKOMENDACJE POLSKIEGO TOWARZYSTWA GINEKOLOGÓW I
POŁOŻNIKÓW ORAZ POLSKIEGO TOWARZYSTWA GENETYKI
CZŁOWIEKA DOTYCZĄCE BADAŃ PRZESIEWOWYCH ORAZ
DIAGNOSTYCZNYCH BADAŃ GENETYCZNYCH WYKONYWANYCH W
OKRESIE PRENATALNYM 2022

ptgc



Materiał do wykonania diagnostyki



Dane Laboratorium Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej USDK

(opracowanie dla 1600 pacjentek)

Materiał do wykonania diagnostyki - najczęstsze problemy



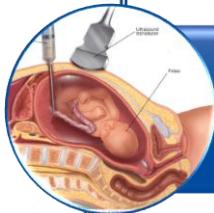
ZBYT DŁUGI CZAS TRANSPOTRU MATERIAŁU DO LABORATORIUM

Czas dłuższy niż 24h uniemożliwia wykonanie badań technikami cytogenetyki (kariotyp klasyczny, rapid FISH)



PŁYN OWODNIOWY SKRWAWIONY (wizualnie widoczne zanieczyszczenie płynu erytrocytami)

W przypadku technik molekularnych (kariotyp molekularny, techniki wykrywające warianty genowe) - ryzyko uzyskania wyniku wskazującego na pozorną mozaikę; uzyskanie wyniku badania dla matki)



POBRANIE ZBYT MAŁEJ ILOŚCI MATERIAŁU (trofoblast, płyn owodniowy)

W przypadku wykonania amniopunkcji zbyt wcześnie, lub pobraniu zbyt małej ilości płynu owodniowego, czy konieczności wykonania dużej liczby oznaczeń technikami cytogenetycznymi oraz technikami biologii molekularnej → konieczność przeprowadzenia hodowli komórkowej → wydłużenie czasu oczekiwania na wynik



POBRANIE KRWI PĘPOWINOWEJ NA ODPOWIEDNIĄ PROBÓWKĘ

badania cytogenetyczne (kariotyp klasyczny) – antykoagulant - heparyna litowa; badania technikami molekularnymi - antykoagulant EDTA

Trudny lub prosty wybór testu diagnostycznego...

Czy spodziewam się u płodu aberracji chromosomowej liczbowej?

Czy spodziewam się u płodu aberracji chromosomowej strukturalnej (np. mikrodelecji)?

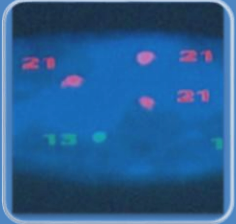
Czy podejrzewam konkretny zespół?

Czy obserwuję u płodu objawy choroby monogenowej?

Czy podejrzewam konkretną chorobę (u płodu/ członków rodziny)?

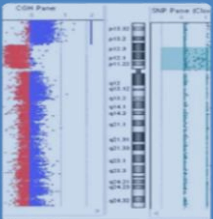
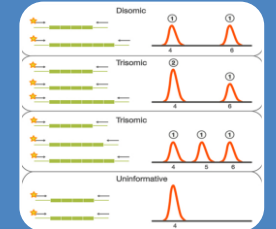


Dostępne metody diagnostyki genetycznej płodu



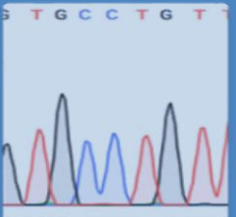
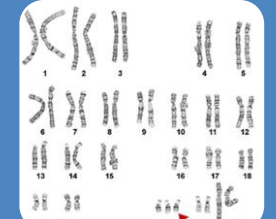
Szybkie wykluczenie aneuploidii chr 13,18,21, X

- FISH interfazowy
- QF-PCR



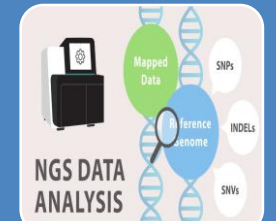
Ocena kariotypu płodu

- kariotyp techniką klasyczną (GTG)
- kariotyp techniką molekularną (aCGH)



Diagnostyka wariantów genowych

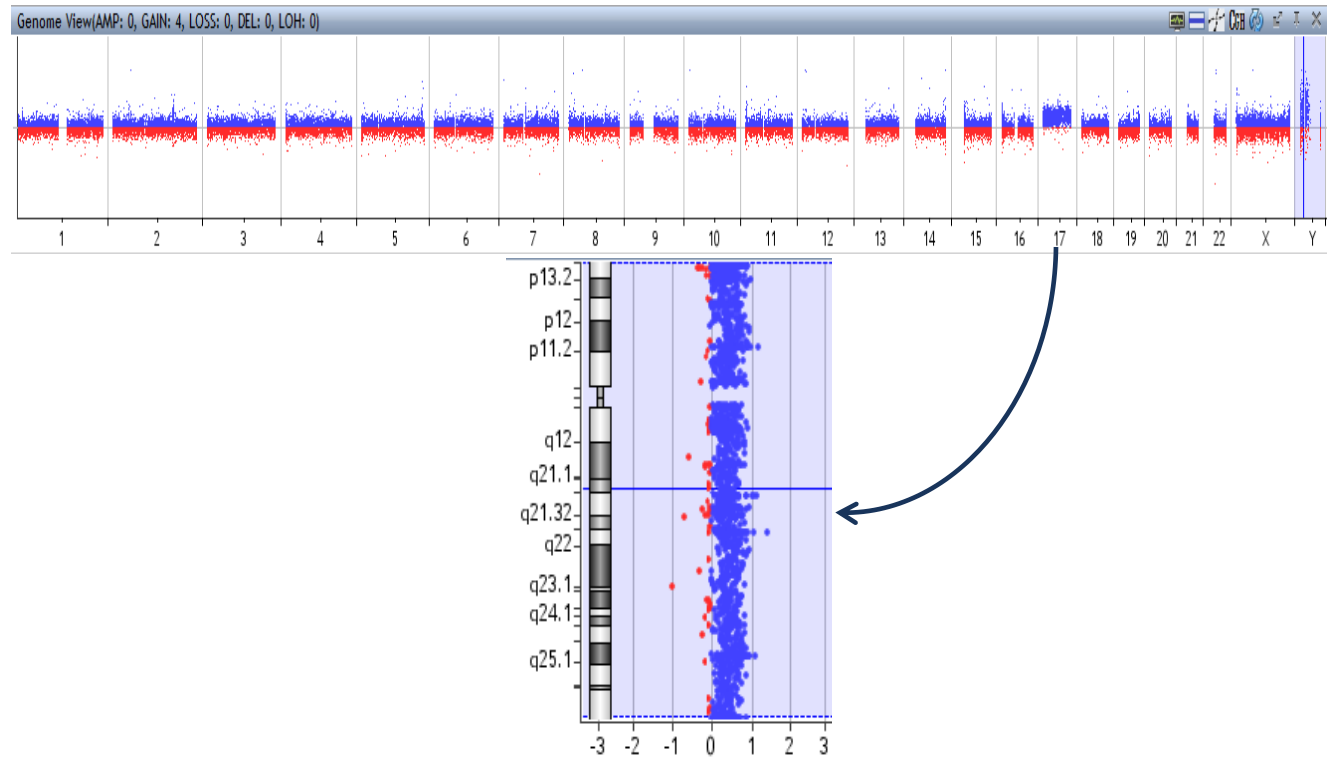
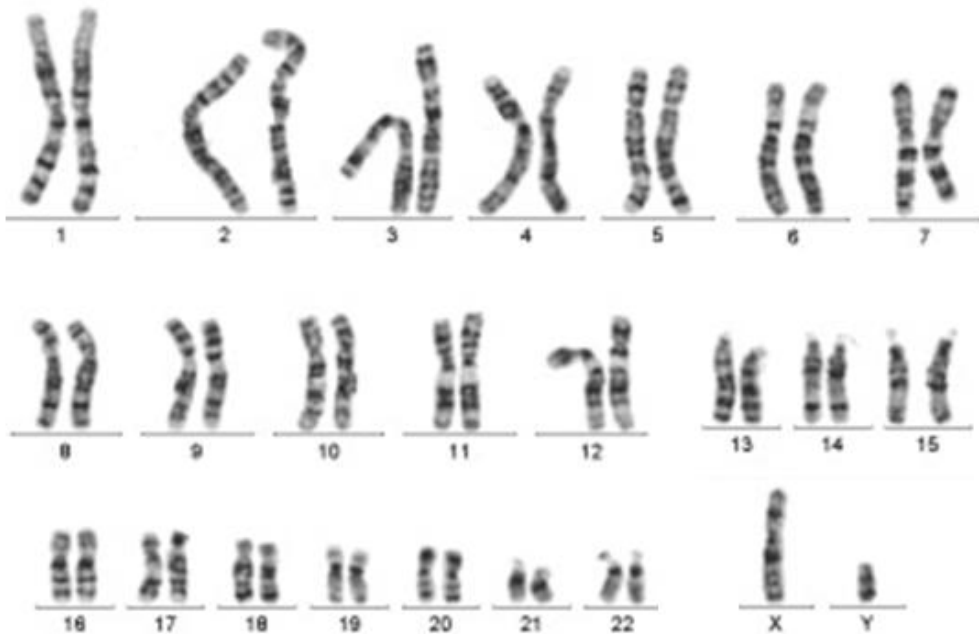
- Sekwencjonowanie Sangera
- Prenatal WES, analizy panelowe NGS
- MLPA/msMLPA



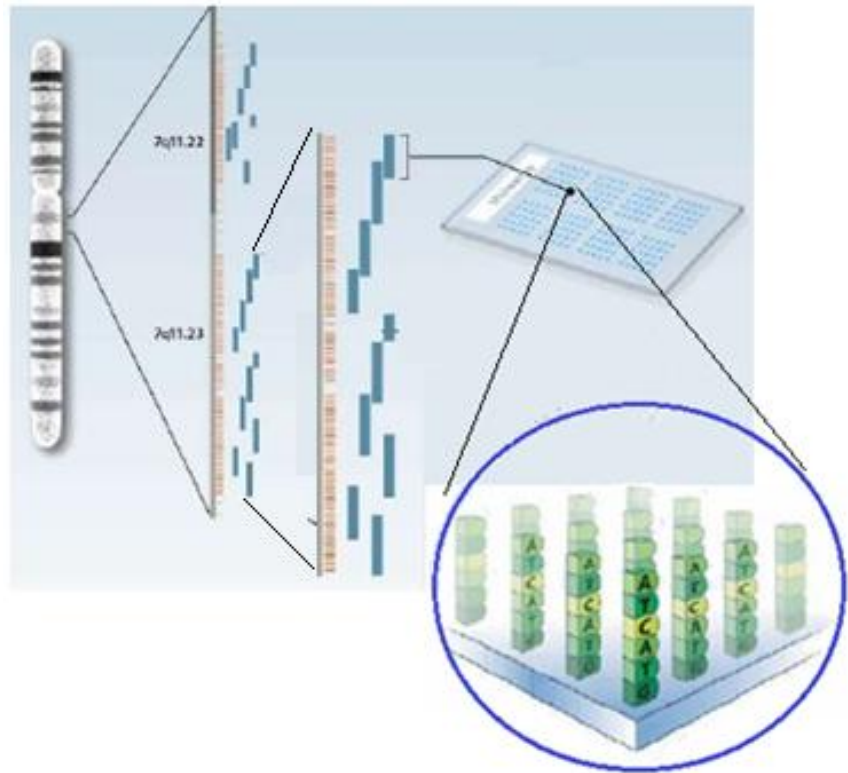
Wszystko na raz ... Ocena kariotypu płodu

Kariotyp klasyczny (GTG)

Kariotyp molekularny (aCGH)



Ocena kariotypu płodu techniką mikromacierzy aCGH



Materiał biologiczny pacjenta

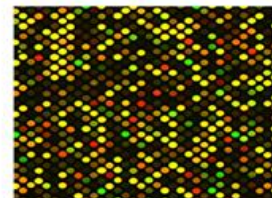
Izolacja DNA

Znakowanie fluorescencyjne

DNA kontrolne

DNA badane

Skanowanie

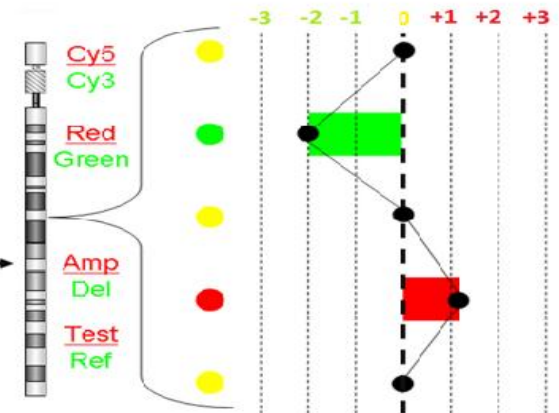


Sygnały fluorescencyjne na macierzy



Interpretacja danych

loss no change gain



Ocena kariotypu płodu techniką mikromacierzy



aCGH

Ocena CNV
(variantów w zakresie
liczby kopii)

aCGH+SNP

Ocena CNV

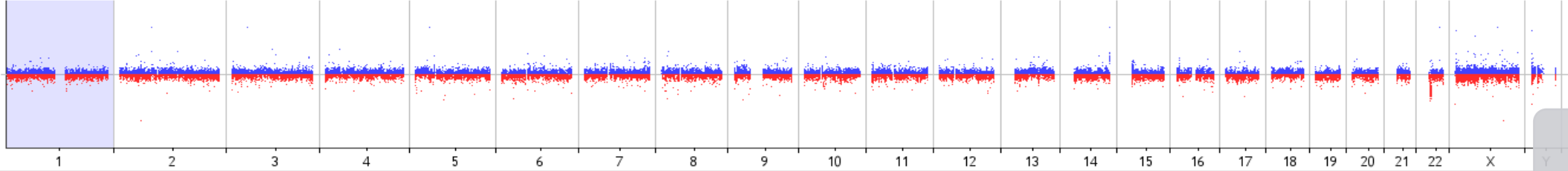
Ocena utraty
heterozygotyczności (LOH)

Ocena disomii
jednorodzicielskiej (UPD)



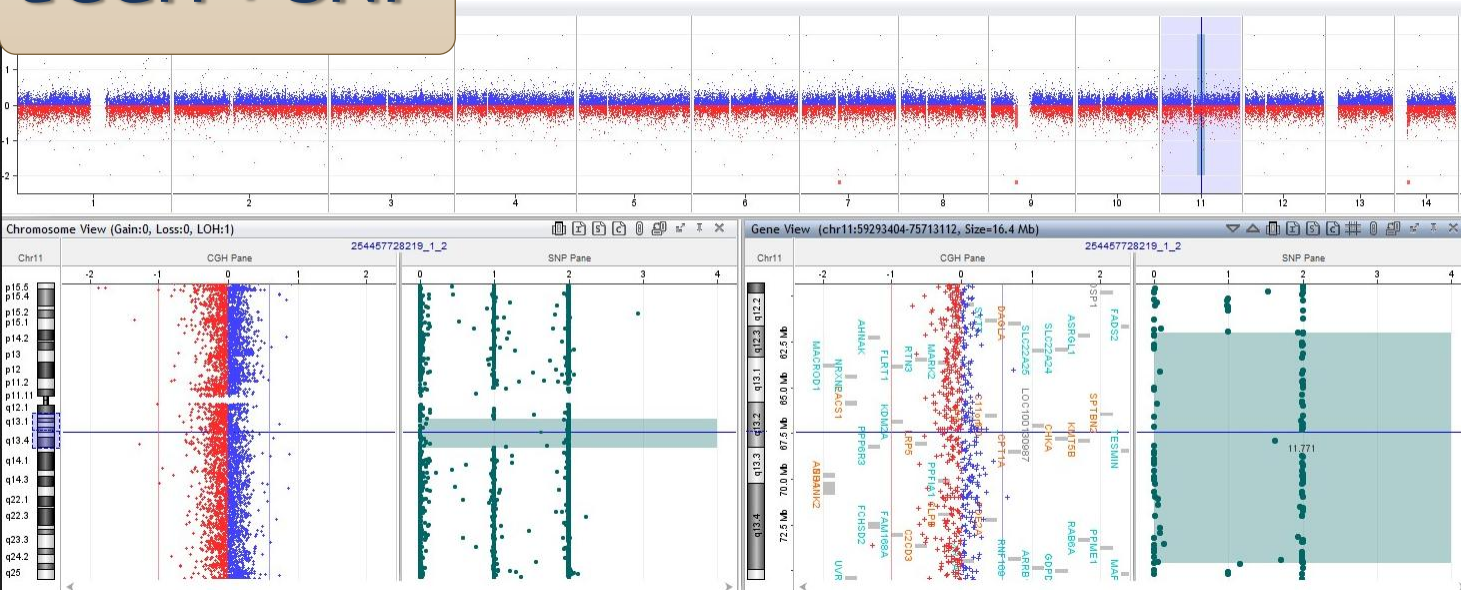
Przykładowe wyniki badania mikromacierzy

Genome View(AMP: 0, GAIN: 0, LOSS: 0, DEL: 0, LOH: 0)

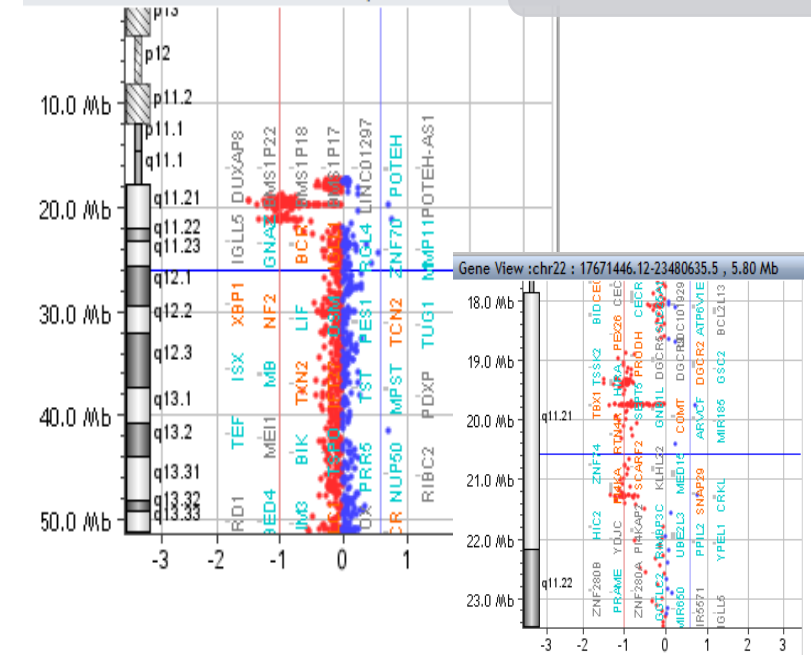


aCGH

aCGH + SNP



Gene View :chr22 : 785274-51304566 , 50.5 Mb



KARIOTYP KLASYCZNY

vs

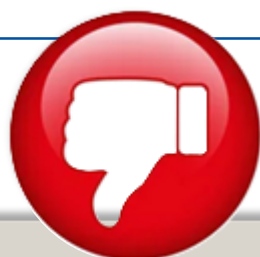
aCGH (KARIOTYP MOLEKULARNY)



Ocena całego zestawu chromosomów – nie wymaga wcześniejszej znajomości konkretnej aberracji.

Ocena zmian liczbowych, nawet w mozaikowej postaci (aneuploidia tj. trisomia, monosomia oraz poliploidia np. triploidia).

Ocena dużych ($\geq 4\text{Mb}$) zmian strukturalnych zrównoważonych i niezrównoważonych, nawet w mozaikowej postaci



Konieczność prowadzenia hodowli komórkowej.

Ograniczona rozdzielczość (dokładność) badania.

Zapis wyniku ISCN 2024:

47,XX,+21



Ocena całego zestawu chromosomów – nie wymaga wcześniejszej znajomości konkretnej aberracji.

Ocena zmian strukturalnych wyłącznie niezrównoważonych, (mikroduplikacje, mikrodelecje), z dużą rozdzielczością!!

aCGH + SNP – możliwość detekcji UPD

Brak konieczności prowadzenia hodowli komórkowej.



Brak możliwości oceny poliploidii oraz mozaiki ($\leq 20\%$ komórek)-tylko aCGH+ SNP

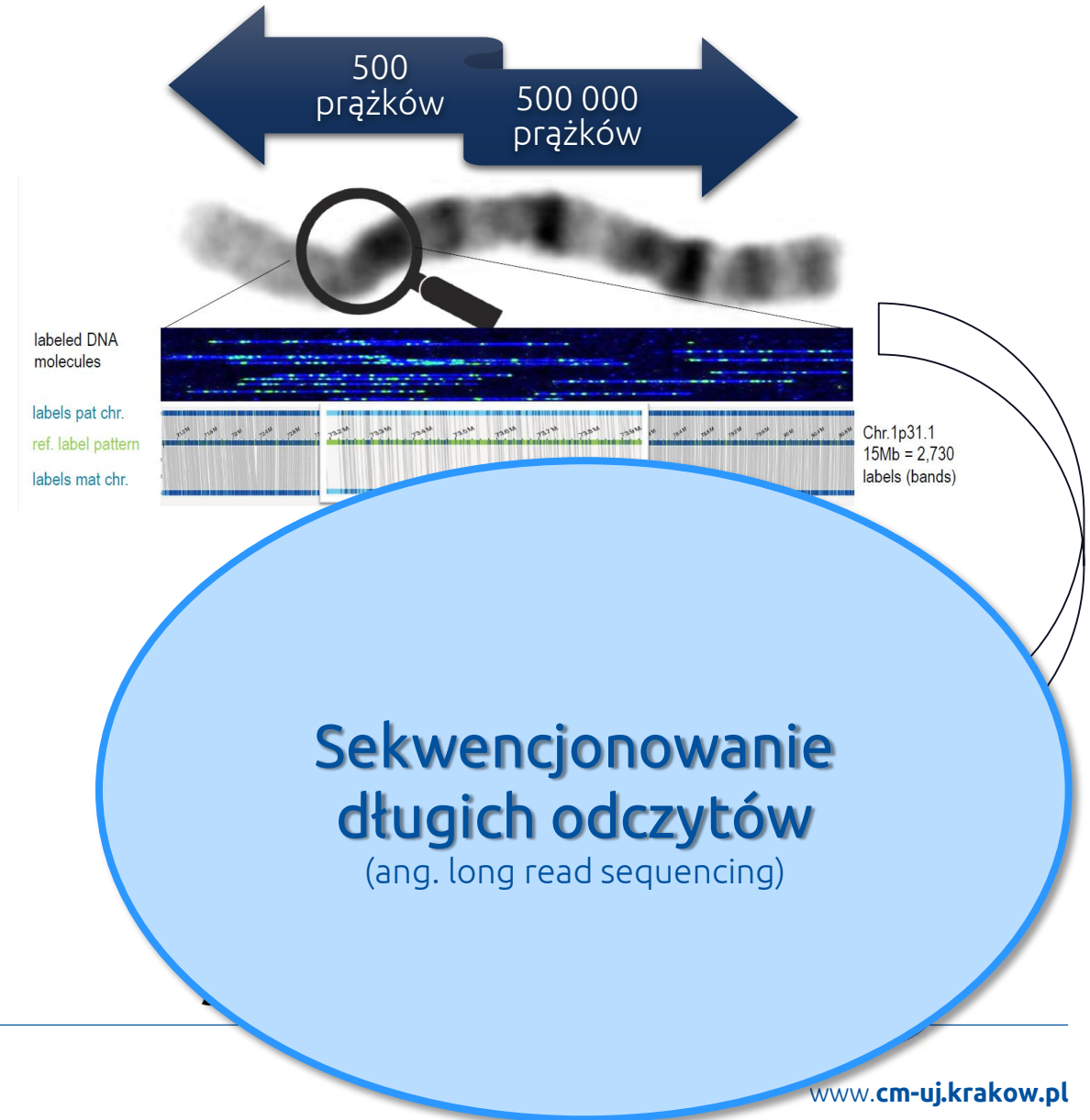
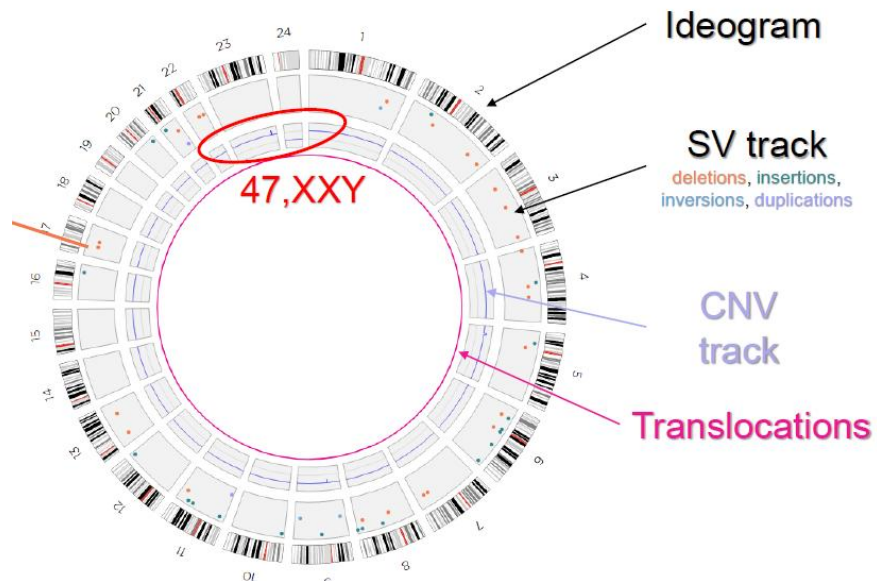
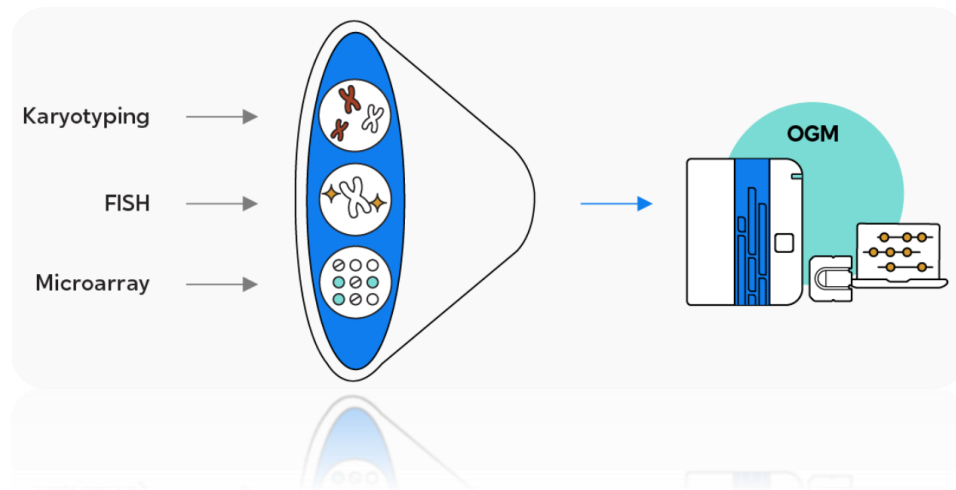
Brak możliwości oceny zmian strukturalnych zrównoważonych.

Zapis wyniku ISCN 2024:

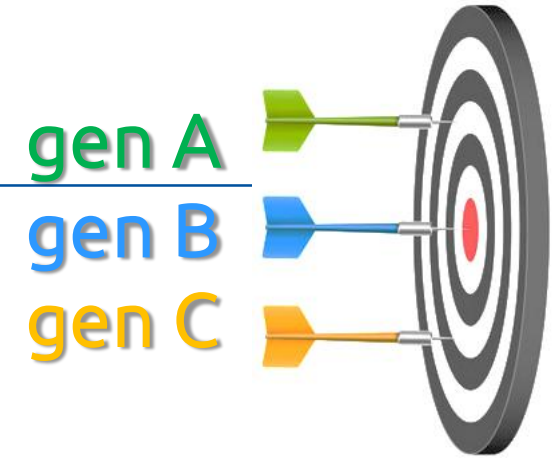
arr[GRCh38]

9q33.2q34.3(12,4205,191_139,389,803)x3

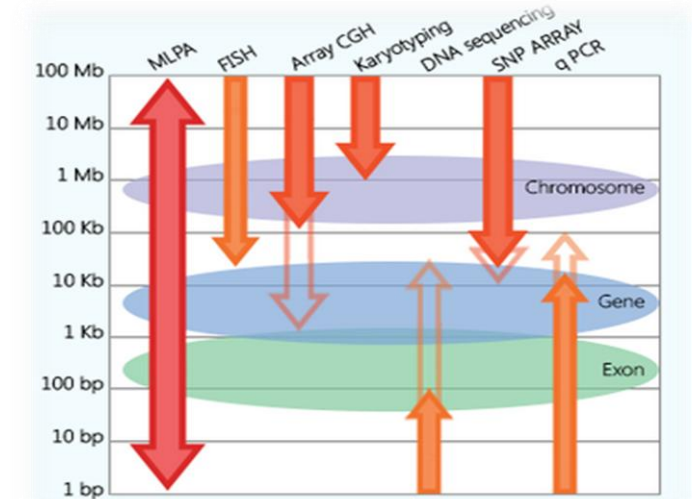
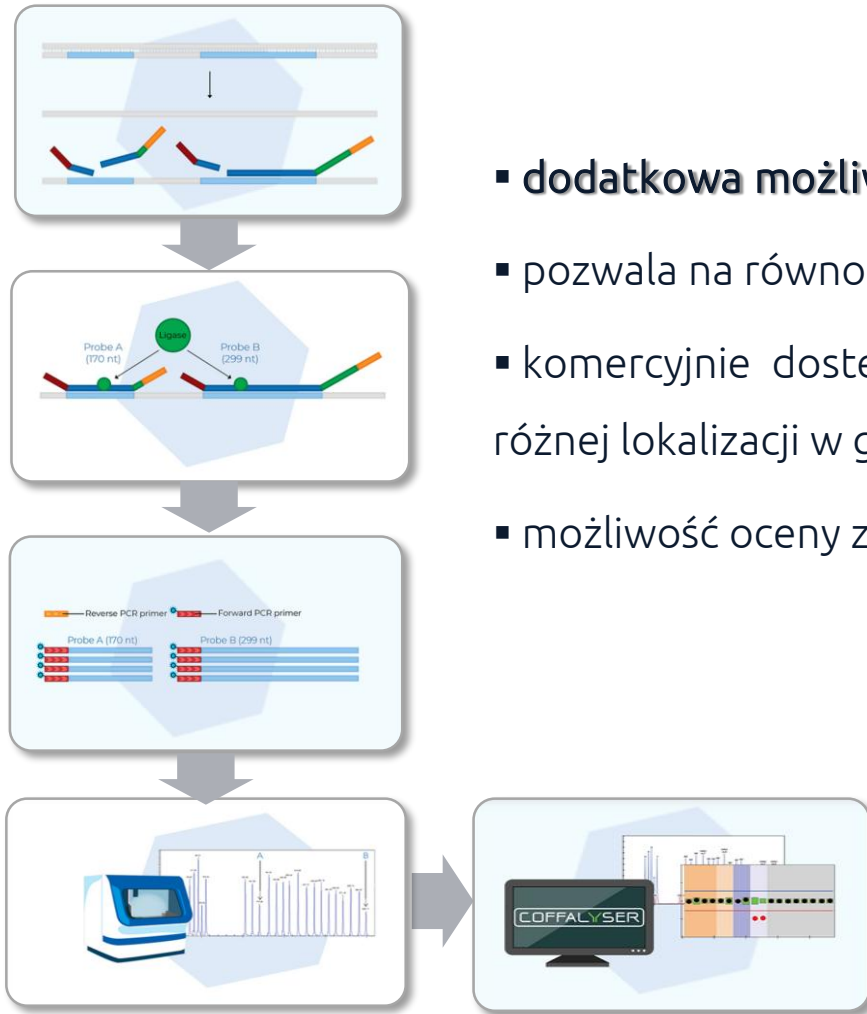
Przyszłość czeka za rogiem... Optyczne mapowanie genomu (OGM)



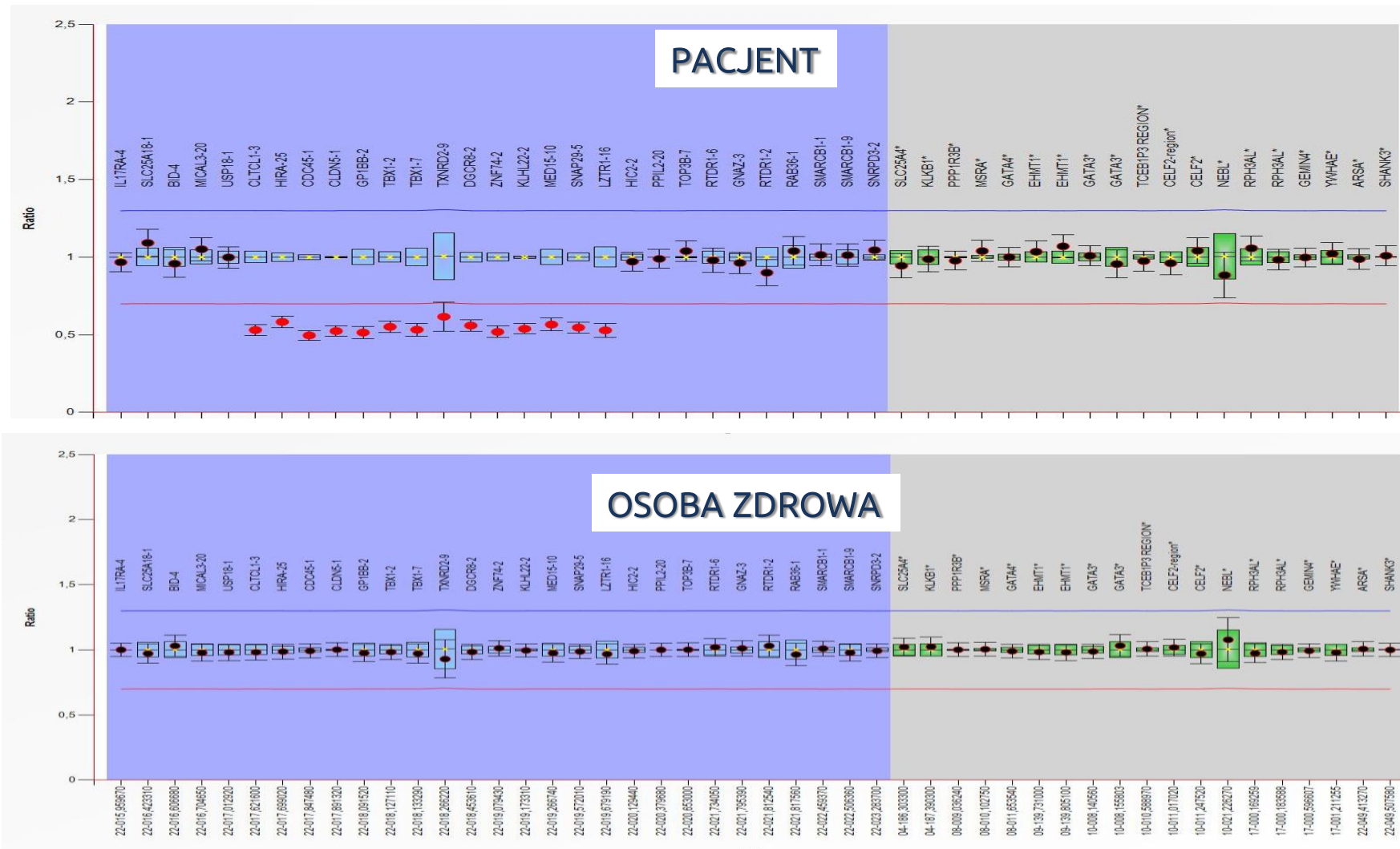
Konkretny cel MLPA/msMLPA



- dodatkowa możliwość o której warto pamiętać
- pozwala na równoczesną analizę do 40 fragmentów DNA pacjenta
- komercyjnie dostępne zestawy pozwalające na równoczesną analizę zmian w wielu genach o różnej lokalizacji w genomie
- możliwość oceny zmian typu UPD dla konkretnych chromosomów



Przykładowe wyniki badania MLPA



Przykładowy zapis
wyniku ISCN 2024:

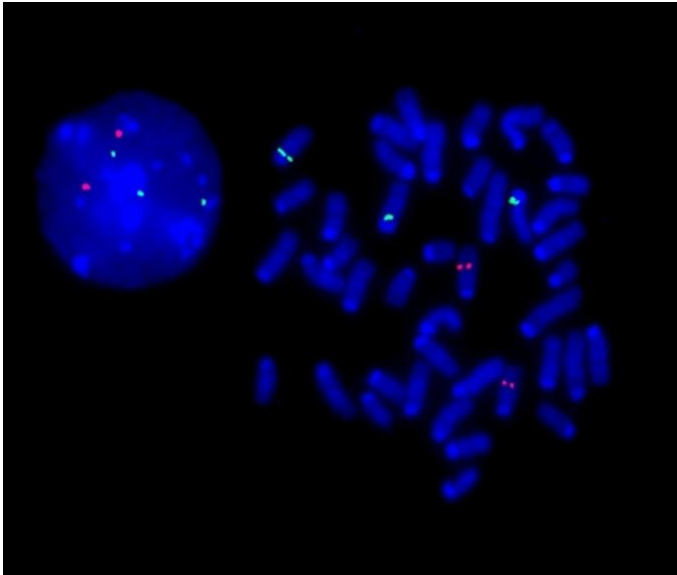
rsa 22q11(P)x1

rsa 22q11(P)x2

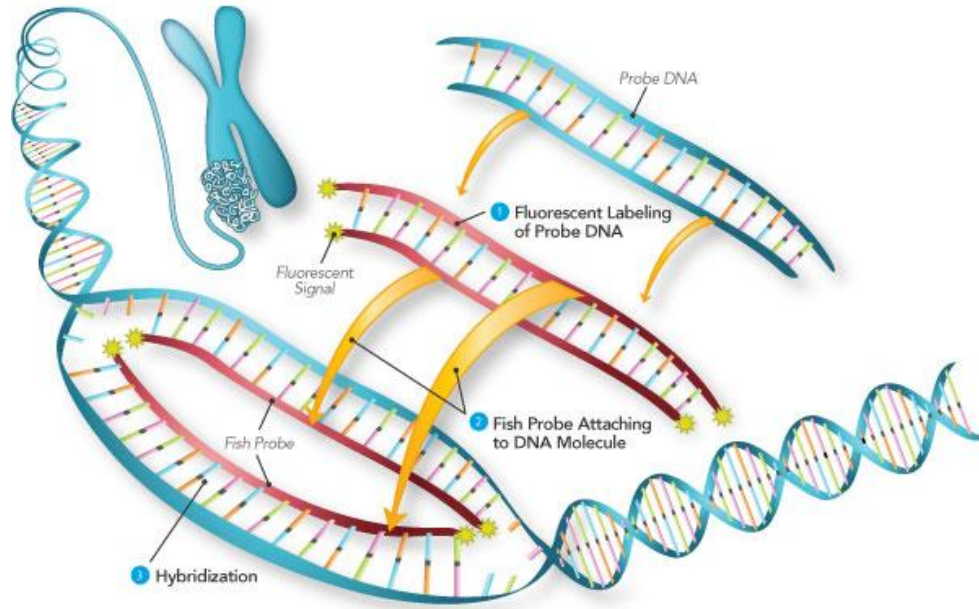
Czas ma znaczenie ...Szybkie testy na wybrane aneuploidie

FISH (fluorescencyjna
hybrydyzacja in situ)

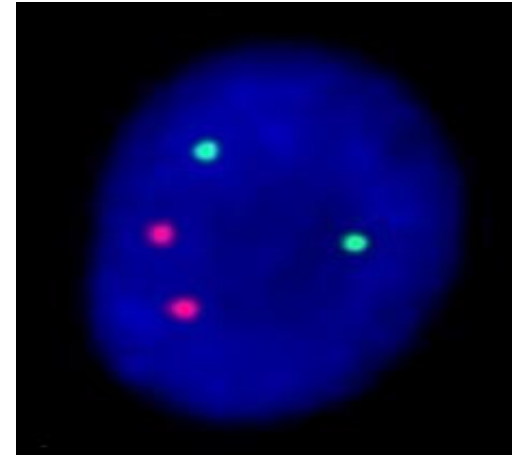
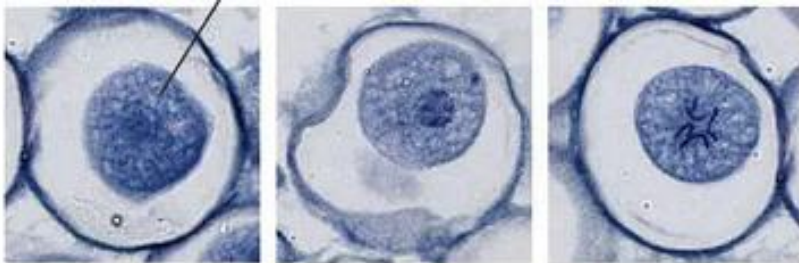
QF-PCR



Celowana detekcja aneuploidii- rapid FISH

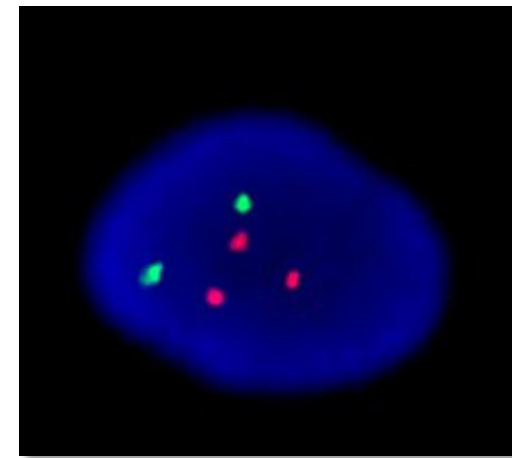


rapid FISH



Przykładowy zapis wyniku
ISCN 2024:

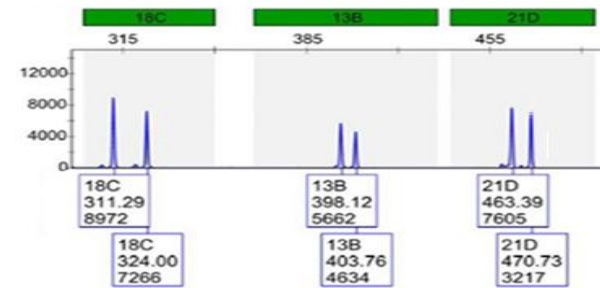
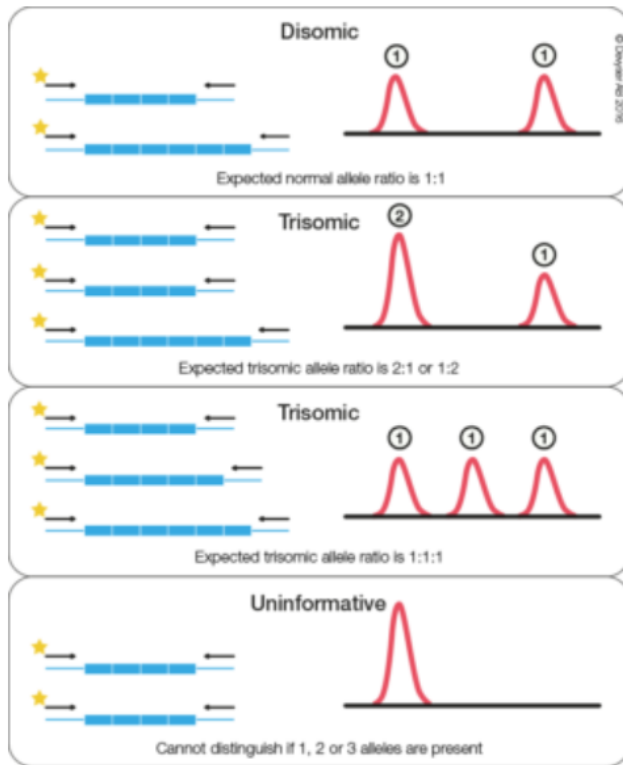
nuc ish(...x2)(...x2)



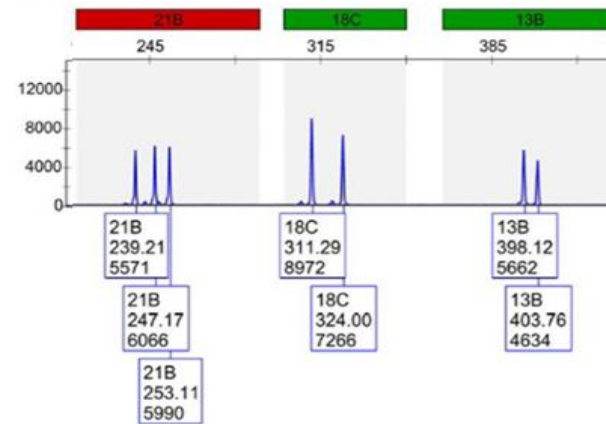
nuc ish(...x3)(...x2)

Celowana detekcja aneuploidii- QF-PCR

- wykorzystanie jako markerów chromosomowych sekwencji STR (ang. short tandem repeats)
- o wyniku decyduje liczba i wysokość pików (odczyt fluorescencji pochodzącej ze znakowanych starterów dla wielu STR jednocześnie)



rsa (13,18,21)x2



rsa (13,18)x2,(21)x3



rsa (13)x2,(18)x3,(21)x2

FISH

VS

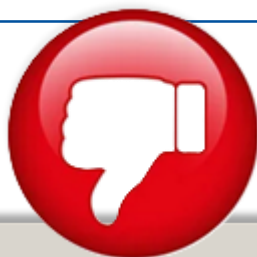
QF-PCR



Ocena zmian liczbowych pojedynczych chromosomów, z możliwością wnioskowania o poliploidalności

Ocena zmian strukturalnych zrównoważonych i niezrównoważonych, z dużą rozdzielczością, nawet w mozaikowej postaci.

Brak konieczności prowadzenia hodowli komórkowej (rapid-FISH interfazowy).



Ocena wybranego chromosomu/regionu – wymaga wcześniejszej znajomości konkretnej aberracji.

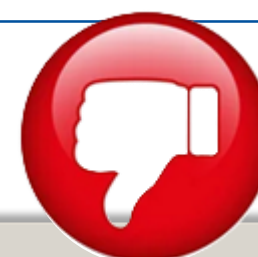
Ograniczona możliwość jednoczesnej analizy wielu miejsc chromosomowych na jednym preparacie.



Ocena zmian liczbowych wybranych chromosomów (np. 13, 18, 21, X, Y), z możliwością wnioskowania o poliploidalności

Brak konieczności prowadzenia hodowli komórkowej.

Wymaga małej ilości materiału biologicznego



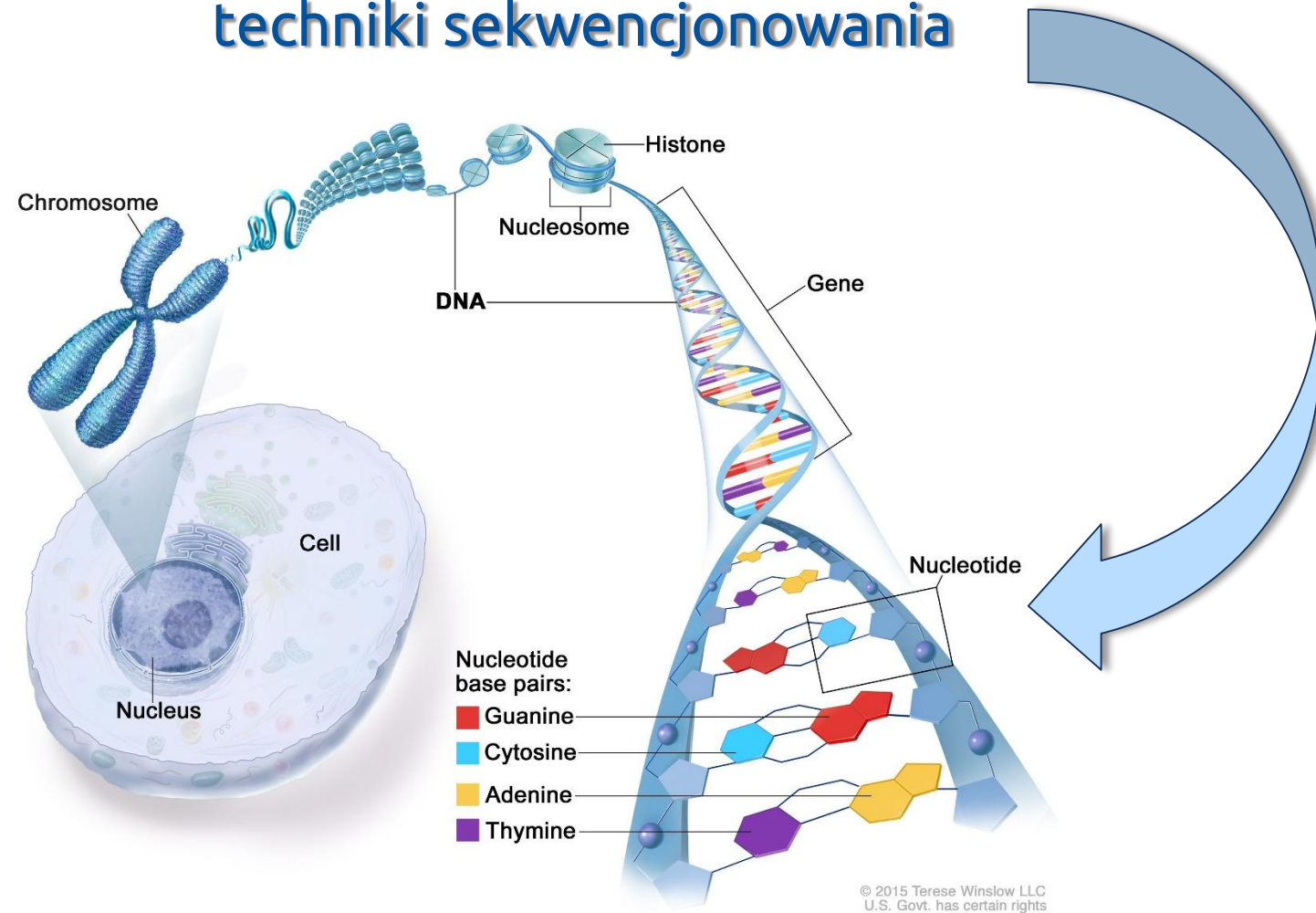
Ograniczony zakres detekcji – możliwość analizy wyłącznie wybranych chromosomów.

Brak możliwości oceny zmian strukturalnych.

Ryzyko fałszywie negatywnego wyniku w przypadku mozaikowości.

Kiedy wydaje się że sprawdziliśmy już prawie wszystko...

techniki sekwencjonowania



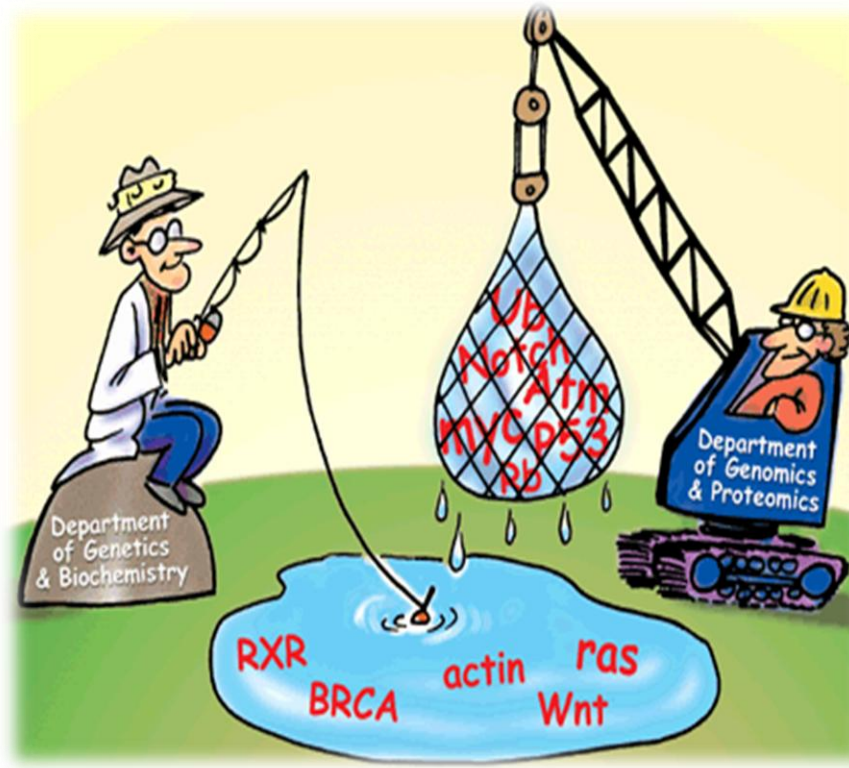
Diagnostyka wariantów genowych

Sekwencjonowanie techniką klasyczną Sangera

Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS)

Celowana ocena sekwencji nukleotydowych w wybranym fragmencie DNA pacjenta

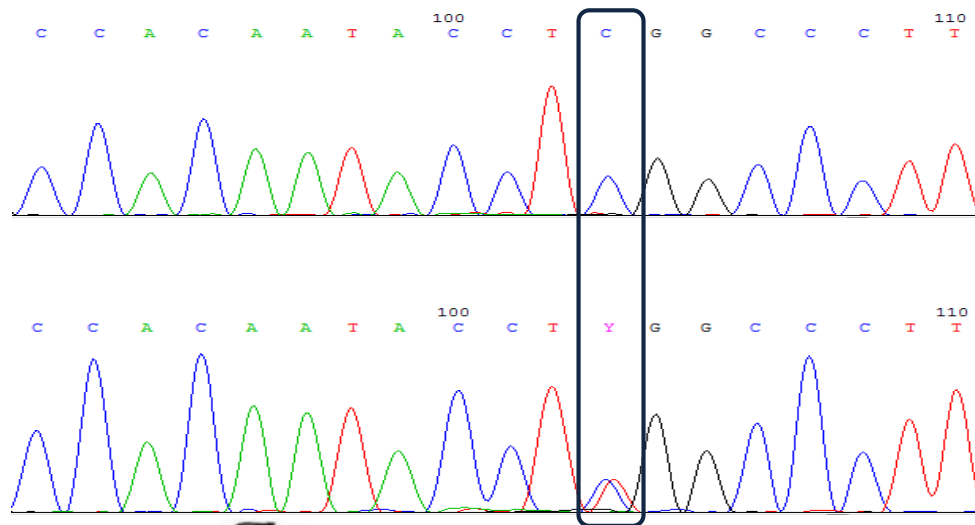
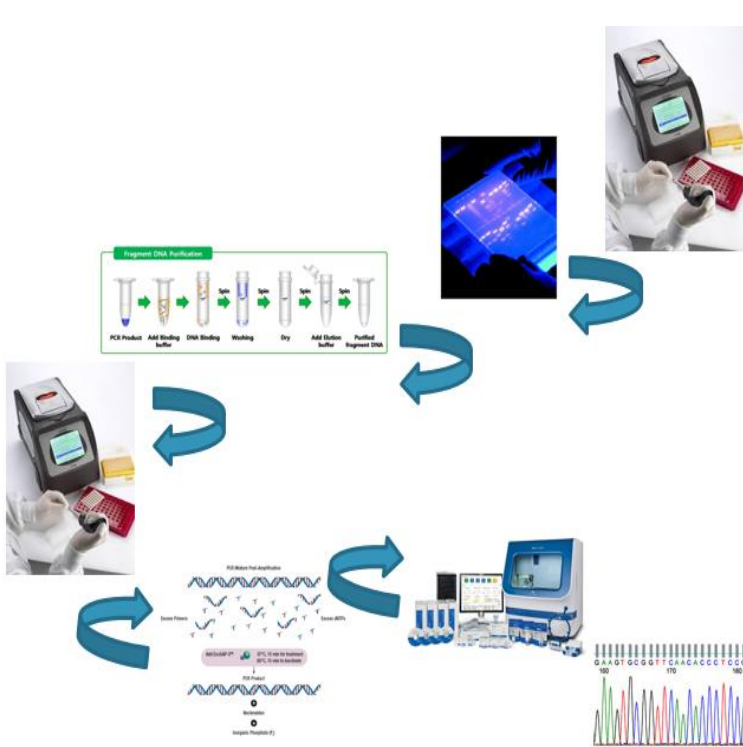
Ocena występowania wariantów genowych typu substytucji, delecji/insercji, niewielkich inwersji.



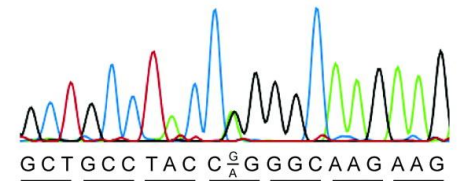
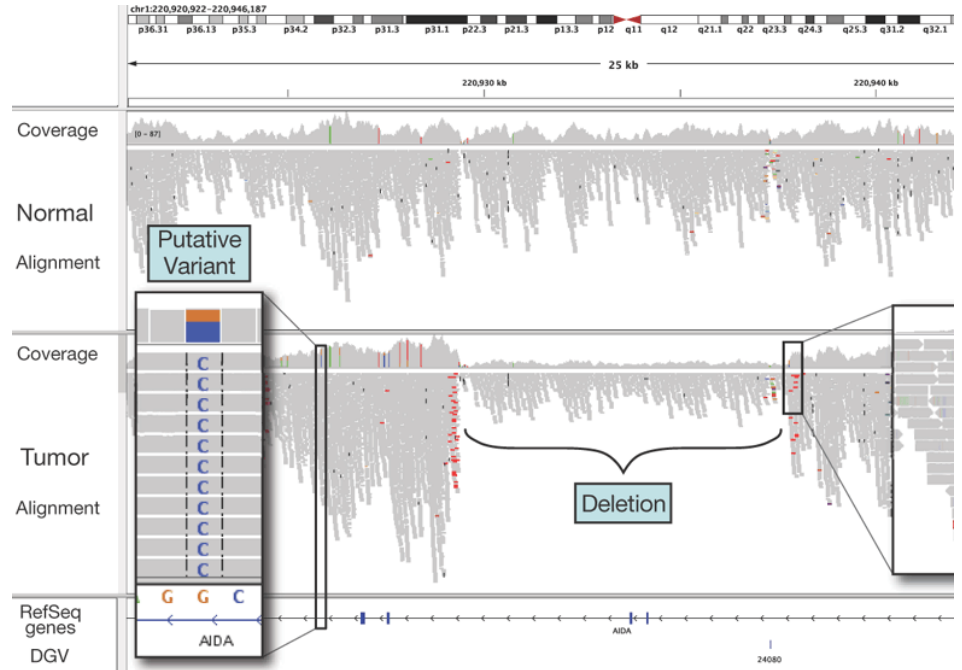
Wysokoprzepustowa ocena sekwencji nukleotydowych pod kątem obecności wariantów typu substytucji nukleotydowych, delecji/insercji, inwersji:

- panele genowe
- WES
- WGS

Sekwencjonowanie techniką klasyczną Sangera



Zapis wyniku wg. HGVS:
NM_000277.3:c.[1222C>T];[1222=]
NM_001354304.2: p.[(Arg408Trp)];[(Arg408=)]



Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS)

Eksom stanowi 1-2% ludzkiego genomu

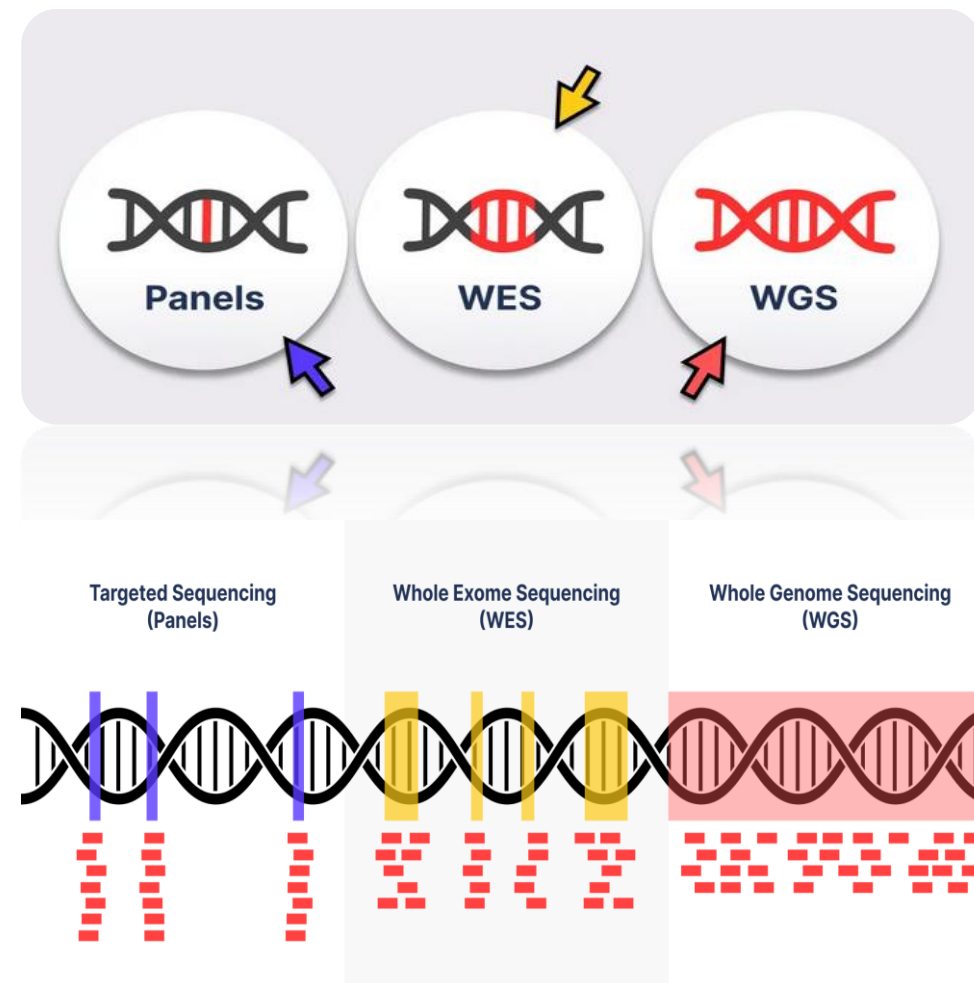
Sekwencjonowanie całego eksomu (WES) = sekwencjonowanie wszystkich eksonów kodujących i granic ekson-intron w jednym teście

(W)ES = sekwencjonowanie (całego) eksomu = generowanie danych

(W)ES ≠ analiza danych

Analiza pod kątem wykrywania wariantów typu CNV stanowi dodatkową analizę bioinformatyczną i nie jest tożsama z wykonaniem badania mikromacierzy (aCGH).

Najlepszym sposobem analizy eksomu pozwalającym na detekcję różnych wariantów (SNVs oraz CNVs) jest wykonanie sekwencjonowania genomu (WGS)



Sekwencjonowanie Sangera

vs

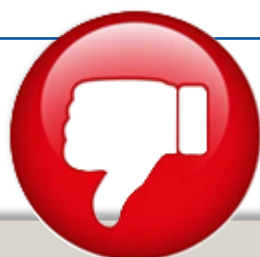
NGS



Bardzo precyzyjny odczyt sekwencji DNA, z niskim poziomem błędów

Niskie koszty dla małych projektów — konkretny pacjent/konkretny wariant

Stosunkowo prosta interpretacja wyników (w przypadku znanych wariantów)



Ocena wybranego fragmentu sekwencji jednego genu - wymaga wcześniejszej znajomości konkretnego wariantu.

W przypadku konieczności analizy całych genów - kosztowna, czasochłonna i małoefektywna



Nie wymaga wcześniejszej znajomości konkretnego wariantu.

Szybka i efektywna w przypadku analizy wielu genów lub całego eksomu/genomu

Możliwość identyfikacji wariantów typu SNV oraz CNV (analiza WGS, WES-z ograniczeniami)



Ryzyko błędów (np. w sekwencjach powtórzeń)

Złożona analiza danych i trudności interpretacyjne

PODSUMOWANIE... Plany na przyszłość...

Strasznie tego dużo !!!

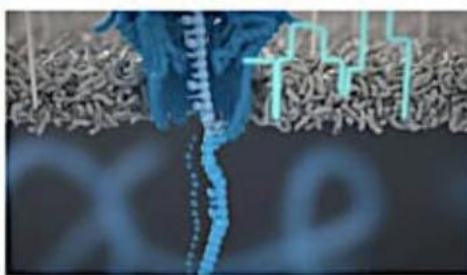
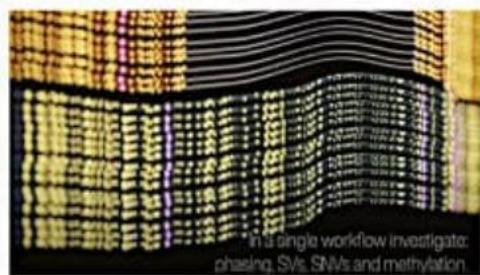
Nadal nie wiem co jest najlepsze !!!

Lepiej zadzwonię do laboratorium to coś mi poradzą!!!

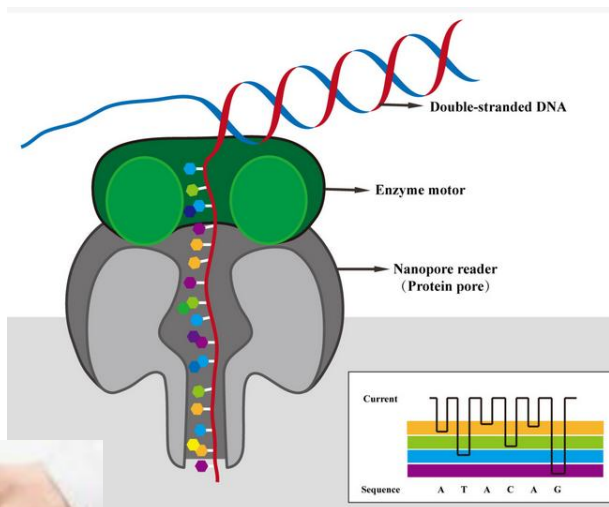
A może jest coś uniwersalnego, co rozwiąże moje problemy....



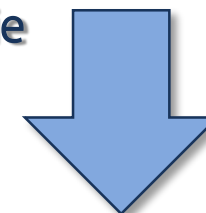
PODSUMOWANIE... Plany na przyszłość...



Analiza natywnej, długiej
cząsteczki DNA pacjenta
→ bez „przetwarzania”



Jedna próbka DNA
Jedno urządzenie
Jedna analiza



Wszystkie potrzebne informacje:

- Warianty strukturalne zrównoważone oraz niezrównoważone
- Warianty typu CNV z ich lokalizacją i orientacją w genomie
- Warianty SNV
- Powtórzenia tandemowe
- Zmiany epigenetyczne

Dziękuję za uwagę

