

Dijagnostički prinos kromosomskog mikropostroja u prenatalnom otkrivanju genomskih poremećaja

Feodora Stipoljev^{1,2}, Maja Oroz¹, Tomislav Hafner¹, Ivanka Bekavac Vlatković^{1,3},
Damir Zudenigo¹, Ratko Matijević^{1,3}, Tamara Vuk¹, Ana Mustapić^{1,4}

Cilj istraživanja je odrediti dijagnostički prinos komparativne genomske hibridizacije na mikropostroju (aCGH) u detekciji submikroskopskih promjena ispod razlučivosti svjetlosne mikroskopije, te pojavnost varijanti nepoznatog značenja koje predstavljaju poseban izazov interpretacije rezultata.

Metode su uključivale retrospektivnu analizu rezultata različitih citogenomskih metoda na ukupno 738 uzoraka korionskih resica i plodovih voda. Indikacije za invazivne zahvate obuhvaćale su abnormalan ultrazvuk ploda, visokorizičan biokemijski ili neinvazivni molekularni test probira, te opterećenu reproduktivnu i obiteljsku anamnezu za genomske poremećaje. Kod svih uzoraka provedena je kromosomska analiza. Analiza aCGH provedena je kod 78 uzoraka korionskih resica i 259 uzoraka plodove vode s normalnim kariotipom ili nebalansiranim strukturnim razmještanjima.

Rezultati: U trudnica koje su upućene na biopsiju korionskih resica udio brojčanih i strukturnih varijanti broja kopija iznosio je 56 %, dok je kod onih koje su upućene na amniocentezu bio 27 %. Brojčani kromosomski poremećaji otkriveni su u 32 % plodova, gdje se najveći udio odnosio na trisomiju 21 i 18. Nebalansirana strukturna razmještanja roditeljskog podrijetla nađena su u 19 plodova, balansirane recipročne i Robertsonove translokacije u 14 plodova. Varijante broja kopija kod normalnog kariotipa dobivene su u 14 plodova, sedam je klasificirano kao patogene, a sedam kao varijante nepoznatog značenja. Submikroskopske patološke kao i varijante broja kopija nepoznatog značenja detektirane su u 2,48 % od ukupnog broja trudnoća.

Zaključci: Rutinsko korištenje metode aCGH u prenatalnoj dijagnostici povećalo je dijagnostički prinos detekcije različitih tipova genomskih poremećaja. Kako ipak značajan broj njih ostaje neotkriven, posebice u skupini plodova s višestrukim malformacijama, potrebno je u standardnu praksu uvesti i metode sekvenciranja nove generacije.

Ključne riječi: PRENATALNA DIJAGNOSTIKA; KOMPARATIVNA GENOMSKA HIBRIDIZACIJA; ULTRAZVUK; KONGENITALNE ABNORMALNOSTI

¹Klinika za ginekologiju i porodništvo, Klinička bolnica "Sveti Duh", Sveti Duh 64, 10000 Zagreb

²Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, J. Huttlera 4, 31000 Osijek

³Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Šalata 2, 10000 Zagreb

⁴Zdravstveno veleučilište Zagreb, Mlinarska cesta 38, 10000 Zagreb

UVOD

Prenatalna dijagnostika genomskih poremećaja podrazumijeva primjenu različitih citogenetskih tehnika te metoda molekularne citogenetike i genetike kod analize fetalnih uzoraka dobivenih jednom od rutinskih invazivnih tehnika - biopsijom korionskih resica ili amniocentezom. Kultivirane stanice uzoraka plodove vode ili korionskih resica standardno se analiziraju klasičnom citogenetskom analizom. Nedostaci metode odnose se na nemogućnost utvrđivanja submikroskopskih promjena manjih od pet do 10 Mb, nemogućnost utvrđivanja podrijetla strukturnih kromosomskih promjena kao što su prekobrojni marker kromosomi ili nebalansirana razmještanja te rjeđe uspjeh kulture stanica.

Komparativna genomska hibridizacija na mikropostroju (aCGH, engl. *Array Comparative Genomic Hybridization*) predstavlja složenu tehniku molekularne citogenetike koja omogućava rješavanje ograničenja klasične citogenetike. Metoda aCGH temelji se na hibridizaciji uzorka DNA s komplementarnim oligonukleotidnim sondama vezanim na mikropostroj (mikročip). Metoda omogućuje detekciju veoma malih strukturnih promjena, submikroskopskih dobitaka ili gubitaka nasljednog materijala, odnosno nebalansiranih strukturnih razmještanja veličine između 50 i 200 kb. Analiza uključuje interpretaciju varijanti broja kopija (CNV, engl. *Copy Number Variations*) poznate patogenosti. Prednost navedene tehnike nad citogenetskom analizom je i to što ne zahtijeva kultivaciju stanica, već se može direktno koristiti nativno tkivo za izolaciju DNA i izvođenje pretrage (1). No ovom metodom ne mogu se utvrditi balansirana strukturna razmještanja kao što su recipročne translokacije i inverzije, zatim triploidije, osim ako se ne koristi SNP-mikropostroj, te mozaicizmi s udjelom kromosomski abnormalnih stanica manjim od 11 do 30 % (2).

U prenatalnoj dijagnostici metoda aCGH je od iznimnog značaja za određivanje podrijetla nebalansiranih strukturnih promjena i sadržaja gena, definiranje točaka loma kod „naizgled“ balansiranih nositelja strukturnih razmještanja *de novo* podrijetla te utvrđivanje submikroskopskih promjena u slučajevima normalnog fetalnog kariotipa dobivenog klasičnom kariotipizacijom. Međutim, rezultati istraživanja dijagnostičkog prinosa aCGH

metode u slučajevima normalnog fetalnog kariotipa su heterogeni. Klinički značajne varijante broja kopija (CNV, engl. *copy number variation*) nalaze se u oko 0,5 % do 0,8 % trudnica upućenih na invazivnu dijagnostiku isključivo radi dobi majke (3, 4) te između 1,2 % i 7,9 % plodova s abnormalnim ultrazvučnim nalazom (5-7). Nadalje, smjernice za primjenu aCGH metode u prenatalnoj dijagnostici genomskih poremećaja nisu jednodnažne. Američko udruženje opstetričara i ginekologa (ACOG) i Društvo za maternalno-fetalnu medicinu (SMFM) preporučuju obavezno korištenje metode kromosomskih mikropostroja za genetsku evaluaciju ploda s normalnim kariotipom i ultrazvučnim anomalijama (8). U usporedbi, za pacijentice koje se na invazivnu prenatalnu dijagnostiku upućuju zbog drugih indikacija, odnosno kada se radi o normalnom fetalnom ultrasonogramu, ACOG preporučuje provođenje samo jedne metode – ili klasične kariotipizacije G-pruganjem ili aCGH analize. Fiorentino i sur. (3) predlažu aCGH kao prvi test citogenomske analize za sve indikacije, a zatim se ovisno o rezultatu analize eventualno primjenjuju druge dijagnostičke metode.

Određivanjem učestalosti klinički značajnih CNV-ova u ovom istraživanju utvrdili bismo dijagnostički prinos metode aCGH u odnosu na klasičnu kariotipizaciju. Odredit će se i broj detektiranih varijanti nepoznatog značenja (VUS, engl. *variant of uncertain significance*) za koje nije dokazano kliničko značenje i koje predstavljaju izazove u interpretaciji nalaza, posebice u prenatalnoj dijagnostici.

MATERIJALI I METODE

U retrospektivno istraživanje uključili smo podatke 726 trudnica upućenih na invazivnu prenatalnu dijagnostiku u Kliniku za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice „Sveti Duh“ u razdoblju od siječnja 2020. do prosinca 2024. godine. Indikacije za invazivne zahvate, biopsiju korionskih resica (CVS, engl. *chorionic villus sampling*) ili ranu amniocentezu, bile su: povišeni rizik za kromosomopatije dobiven neinvazivnim prenatalnim testovima analize slobodno cirkulirajuće fetalne DNA u krvi majke (NIPT) ili kombiniranog probira, zbog abnormalnog ultrasonografskog nalaza u prvom ili drugom tromjesečju trudnoće, opterećene obi-

teljske ili osobne anamneze za genomske bolesti, ili starije dobi majke (≥ 35 godina u terminu poroda). Prije provođenja invazivnog zahvata svim trudnicama detaljno je objašnjena svrha invazivnog postupka, potencijalne komplikacije, vrijeme potrebno za dobivanje rezultata te ograničenja postupka, što su i potvrdile pisanim pristankom. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice „Sveti Duh“.

Ultrazvučna evaluacija prvog tromjesečja provedena je u razdoblju trudnoće od 11 do 13 tjedana i 6 dana, odnosno pri dužini tjeme-trtica od 45 mm do maksimalno 84 mm. Veličina vratne prozirnosti (VP) određivana je transabdominalnim i/ili transvaginalnim putem. Vrijednosti debljine VP korelirane su s udaljenosti tjeme-trtica i vrijednosti iznad 95. centilne krivulje su smatrane povećanim vrijednostima, odnosno vrijednost iznad 3 mm neovisno o udaljenosti tjeme-trtica. Za procjenu nosne kosti fetusa prikazuju se tri različite linije na razini nosa fetusa: gornja linija predstavlja kožu, donja, koja je deblja i ehogenija od kože iznad nje, predstavlja nosnu kost a treća linija ispred kosti i na višoj razini od kože predstavlja vrh nosa. Smatra se da je nosna kost prisutna ako je ehogenija od kože i odsutna ako nije vidljiva ili je njezina ehogenost ista ili manja od one na koži. Kvalitativna procjena protoka krvi duktus venosusa (DV) temeljila se na pojavi a-vala: pozitivno ili odsutno (normalno), obrnuto (nenormalno). U drugom tromjesečju trudnoće indikacije za invazivnu dijagnostiku bili su abnormalni obrasci rasta ploda, odnosno intrauterini zastoj rasta ploda (IUGR) te različiti tipovi strukturalnih anomalija ploda povezanih s genomskim abnormalnostima kao što su srčane greške, malformacije središnjeg živčanog sustava, defekti prednje trbušne stijenke, defekti neuralne cijevi, abnormalnosti gastroabdominalnog i koštanog sustava, lica i vrata, pluća i toraksa, te poremećaji količine plodove vode.

Biopsija korionskih resica izvodi se transabdominalno, između 11. i 14. tjedna trudnoće. Iglom se pod kontrolom ultrazvuka aspirira 15 do 20 mg posteljičnog tkiva (resičasti korion). Rana amniocenteza se izvodila između 15. i 20. tjedna trudnoće. Punkcija se provodi pod kontrolom ultrazvuka u slobodni džep plodove vode i aspirira se do 20 mililitara plodove vode.

Klasična citogenetska analiza uzoraka korionskih resica i plodove vode provedena je prema smjernicama Europskog udruženja citogenetičara (ECA, engl. *European Cytogeneticists Association*) na kromosomskim preparatima bojanim metodom G-pruganja (9). Stanice plodove vode kultiviraju se dugotrajnom kulturom, dok se prilikom kultiviranja stanica korionskih resica primjenjuje kombinacija dviju tehnika: kratkotrajne kulture citotrofoblasta i dugotrajne kulture mezenhimne strome. Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH, engl. *fluorescence in situ hybridization*) provodi se na kultiviranim ili nativnim uzorcima staničnih suspenzija uz primjenu komercijalno dostupnih sonde, prema uputama proizvođača. Za potrebe aCGH analize DNA je izolirana iz nativnog uzorka korionskih resica ili kulture stanica plodovih voda. Genomsku DNA izolirali smo komercijalnim kitovima QIAamp DNA Mini Kit ili QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), prema uputama proizvođača. Metoda aCGH provodila se na platformi SurePrint G3 8x60K CGH u razdoblju od siječnja 2020. godine do studenog 2021. godine te u narednom razdoblju na platformi GenetiSure Cyto 8x60K CGH (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Kao referentni uzorak korišten je komercijalni uzorak DNA odgovarajućeg spola (Agilent Technologies). Rezultati su analizirani računalnim programom CytoGenomics 5.3.0.14. (Agilent). Analiza varijanti provodi se provjerom njihova kliničkog značaja u medicinskim bazama podataka i dostupnoj medicinskoj literaturi. Koristili smo sljedeće baze podataka: DECIPHER, ClinVar, ClinGen, DGV (engl. *Database of Genomic Variants*), gnomAD, UCSC i OMIM. Interpretacija i prijavljivanje CNV provodi se prema smjernicama Američkog udruženja za medicinsku genetiku i genomiku (10). Na temelju kliničkog značaja varijante se klasificiraju kao patogene, vjerojatno patogene, varijante nepoznatog značenja, vjerojatno benigne i benigne. U nalazu aCGH analize prijavljuju se samo varijante patogenog kliničkog značaja i VUS, dok se benigne varijante ne prijavljuju.

REZULTATI

Ukupno smo analizirali 738 uzoraka, od koji su 208, odnosno 28 % bile korionske resice, a 530, odnosno 72 % uzorci plodovih voda. Indikacije za pojedinu vrstu invazivnog zahvata, dob trudnica i gestacijska dob kada se zahvat radio navedeni su u

Tablica 1. Prikaz anamnestičkih podataka i raspodjela indikacija za invazivnu dijagnostiku

| | CVS | Amniocenteza |
|---|-------------------|-------------------|
| Broj zahvata | 208/738 (28 %) | 530/738 (72 %) |
| Dob trudnice | 34 (20 – 44) | 35 (16 – 48) |
| Gestacijska dob | 13 (11 – 14) | 17 (13 – 35) |
| Indikacija* | | |
| NIPT visokorizičan za T21 | 58 | 56 |
| NIPT visokorizičan za T18 | 8 | 9 |
| NIPT visokorizičan za T13 | 3 | 10 |
| NIPT visokorizičan za 45,X i ostale gonosomopatije | - | 20 |
| NIPT visokorizičan za numeričke poremećaje ostalih autosoma | 1 | 7 |
| NIPT visokorizičan za strukturne CNV-ove | - | 14 |
| NIPT neinformativan | - | 15 |
| Abnormalan ultrazvuk ploda | 85 | 176 |
| Dob majke | - | 66 |
| Pozitivna obiteljska anamneza za kromosomopatije | 22 | 52 |
| Povišen kombinirani test probira | 4 | 82 |
| Genetska mutacija u obitelji | 27 | 13 |

* kod 10 trudnica amniocenteza je provedena zbog sumnje na infekciju i uzorci plodove vode su poslani na PCR analizu

tablici 1. U skupini trudnica kod kojih je dob majke bila jedina indikacija, a koje su upućene na amniocentezu, dobili smo jedan patološki nalaz koji se odnosio na sindrom Down (1/66, 1,51 %). Kod ukupno 40 pacijentica se provelo genetičko testiranje obiteljskih mutacija. Povišen biokemijski test probira, odnosno trostruki ili dvostruki test probira, te u najvećem broju kombinirani test probira uz uredan fetalni ultrazvuk bio je indikacija kod 86 trudnica. Rezultati kromosomske analize pokazali su četiri trisomije 21, dvije trisomije 18, dvije trisomije 13 i dicentrični Yp kromosom (9/86, 10,5 %). Indikacija pozitivne obiteljske anamneze uključivala je jednog od roditelja nositelja strukturnog naoko balansiranog razmještanja (46/74, 62 %) ili obiteljsku/reproduktivnu anamnezu pozitivnu na *de novo* numerički ili strukturni genomski poremećaj- varijante dobitka ili gubitka broja kopija (28/74, 38 %). U 12 plodova analizom je dobiveno balansirano strukturno razmještanje, u 13

nebalansirano, dok su ostali imali normalan kariotip. U skupini trudnica koje su upućene na biopsiju korionskih resica udio numeričkih i strukturnih varijanti broja kopija iznosio je 56 % (116/208) (Slika 1A). Ako isključimo trudnice koje su upućene radi obiteljske patogene mutacije udio je veći i iznosi 64 % (116/181). U skupini trudnica koje su bile na amniocentezi udio numeričkih i strukturnih varijanti broja kopija iznosio je 27 % (142/530), koji se nije značajno promijenio ako isključimo trudnice koje su upućene radi obiteljske patogene mutacije i infekcije u trudnoći (Slika 1B). Raspodjela različitih tipova genomskih poremećaja nađenih nakon biopsije korionskih resica i amniocenteze navedena je u tablici 2.

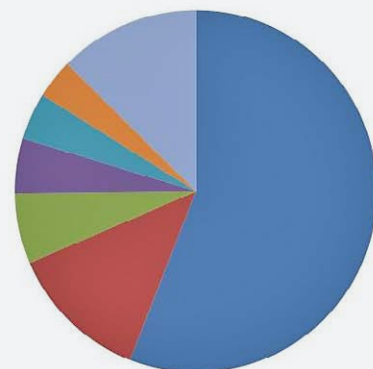
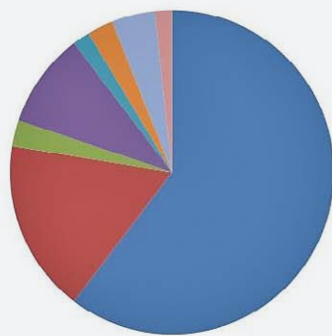
Udio trudnica s visokorizičnim NIPT kao primarnom indikacijom, iznosio je 33,6 % (70/208) u skupini koje su upućene CVS, dok je u skupini trudnica za amniocentezu iznosio 25 % (131/530). Sve trudnice koje su upućene na amniocentezu zbog neinformativnog NIPT su imale normalan nalaz citogenetske i aCGH analize. Rezultati analize i pozitivna prediktivna vrijednost za različite tipove genomskih poremećaja kod visokorizičnog NIPT prikazane su u tablici 3. Rijetki autosomni poremećaji uključivali su trisomije kromosoma 5, 7, 8, 9, 15 i 16 kod trudnica upućenih na amniocentezu. Kod jedne trudnice upućene na CVS, NIPT je pokazao visoki rizik za triploidiju, što je dijagnostičkim metodama isključeno. U tri lažno pozitivna slučaja uputna indikacija je bila visoki rizik za 22q11.2 mikrolelecijski sindrom. Kod trisomije 13, šest potvrđenih nalaza visokorizičnog NIPT imalo je udružene i ultrazvučno detektirane abnormalnosti ploda.

Kod trudnica koje su upućene na biopsiju korionskih resica, kod njih 85 abnormalan ultrazvuk ploda bila je primarna indikacija. Dvadeset i jedan plod imao je izoliranu povećanu vratnu prozirnost i kod njih šest je nađen patološki kariotip. Kod tri ploda s trisomijom 18 uz VP je bio udružen i hidrops. Kod šest plodova uz VP je nađen i DV – A-val, od kojih su tri imala trisomiju 21. Kod tri ploda s omfalokelom radilo se o trisomiji 18. Rani intrauterini zastoje rasta je utvrđen kod tri ploda, od kojih su dva bila triploidna.

Kod 176 trudnica upućenih na amniocentezu primarna indikacija za invazivnu dijagnostiku bio je abnormalan ultrazvuk ploda. Radi izolirane pove-

A) BIOPSIJA KORIONSKIH RESICA

B) AMNIOCENTEZA



Slika 1. Raspodjela brojčanih i strukturnih kromosomskih abnormalnosti dobivenih citogenetskom analizom uzoraka biopsije korionskih resica i plodovih voda

ćane VP u prvom tromjesečju upućene su 33 trudnice od kojih je njih osam imalo patološki kariotip (T21, T18 i jedan strukturni nebalansirani poremećaj). Kod 38 plodova prisutan je bio cistični higrom, a njih osam imalo je udruženu još jednu ili više malformacija. U ovoj skupini dobiveno je 75 % (6/8) patoloških kariotipova (T21, T18, triploidija). Kod ostalih 30 dobiveno je osam patoloških kariotipova (27 % - T18, T21 i dva strukturna razmještanja). Kod septirane ili neseptirane VP koja je bila udružena s hidropsom u 10 plodova, kod četiri dobiven je sindrom Turner, a kod jednog trisomija 18. Kod 16 plodova srčana greška bila je udružena s drugim ekstrakardijalnim malformacijama, dok je kod tri bila izolirana. U skupini plodova sa srčanom greškom udruženom s višestrukim malformacijama 11 je bilo patološkog kariotipa (68,7 %, 11/16). Višestruke malformacije ostalih organskih sustava bile su prisutne kod 70 plodova. Češći ultrazvučni biljezi bili su ventrikulomegalija i drugi tipovi anomalija središnjeg živčanog sustava, zatim omfalokela, intrauterini zastoj rasta, poremećaj količine plodove vode, malformacije lica i anomalije gastro-urinarog trakta. Patološki

kariotip nađen je kod 18 (25,7 %) plodova s višestrukim malformacijama.

Kod normalnog i nebalansiranog kariotipa provela se i aCGH analiza. Postupnik prenatalne analize genomskih poremećaja prikazan je na slici 2. Analiziralo se 78 uzoraka korionskih resica: kod njih pet koji su imali nebalansirani kariotip kao posljedicu roditeljskog balansiranog strukturnog razmještanja odredila su se mjesta loma i sadržaj gena unutar gubitka ili dobitka kopije. Kod izokromosoma Xq i mozaičnog oblika za prekobrojni marker kromosom definirala se uključenost eukromatinskih regija. Kod jednog normalnog kariotipa dobiven je *de novo* gubitak jedne kopije regije 6p25.1 veličine 207 kb klasificiran kao varijanta nepoznatog značenja. Regija 6p25.1 sadrži četiri gena od čega su dva protein-kodirajuća morbidna gena u bazi OMIM: LYRM4 (MIM*613311) i FARS2 (MIM*611592).

Analiziralo se 259 uzoraka plodove vode aCGH metodom. U 91 % (237/259) smo dobili uredan molekularni kariotip, a u 9 % abnormalan. Kod 10 slučajeva nebalansiranih strukturnih razmješta-

nja, pet roditeljskog podrijetla i pet *de novo* evaluirane su točke loma i sadržaj gena. Kod 12 pacijentica s normalnim kariotipom, aCGH analiza pokazala je promjene broja kopija. Kod šest pacijentica promjene su klasificirane kao patogene. Kod ploda s mikrognatijom, mikropenisom, oligohidramni-

Tablica 2. Prikaz brojčanih i strukturnih genomskih poremećaja dobivenih klasičnom kariotipizacijom i aCGH analizom

| Vrsta genomskog poremećaja | Broj (udio u ukupnom broju zahvata, %) |
|---|--|
| Brojčani kromosomski poremećaji | |
| Sindrom Down | 150 (20,3) |
| Sindrom Edwards | 38 (5,2) |
| Sindrom Patau | 12 (1,6) |
| Sindrom Turner | 18 (2,4) |
| Sindrom Klinefelter | 6 (0,81)* |
| Ostali poremećaji broja gonosoma | 1 (0,014)** |
| Triploidija | 9 (1,2) |
| Rijetke trisomije | 3 (0,4)*** |
| Strukturne promjene – varijante broja kopija | |
| Nebalansirane translokacije | 15 (2,03) |
| Ostala nebalansirana strukturna razmještanja | 4 (0,5) |
| Balansirane recipročne i Robertsonove translokacije | 14 (1,9) |
| Varijante broja kopija detektirane aCGH metodom - normalni kariotip | 14 (1,9)**** |
| Ukupan broj | 283 (38,4) |

*1 mozaični oblik; **47,XXX;*** trisomija 5, 9, i 16; **** 7 VUS i 7 patoloških CNV

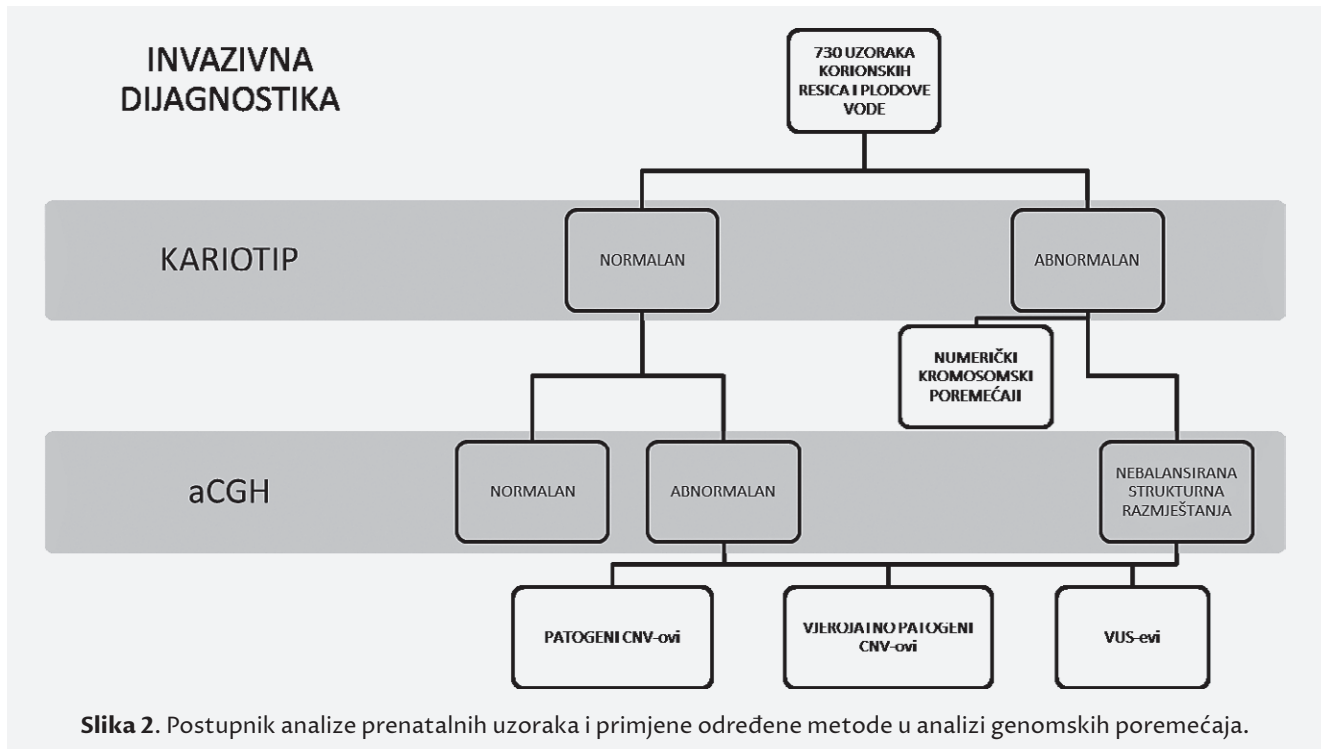
jem i početnim IUGR-om aCGH analiza je pokazala patogeni gubitak jedne kopije regije 22q11.21-q11.22 veličine oko 1 Mb. Nađeni gubitak jedne kopije odgovara mikrodeleciji distalog dijela regije 22q11.2 tipa 1 s točkama loma LCR22-D do LCR22-E (MIM#611867). Kod ploda s hidrocefalusom aCGH analiza je pokazala patogeni terminalni gubitak jedne kopije regije 6q26-q27 veličine oko 6,9 Mb. Kliničke osobitosti uključuju intrauterini zastoj rasta, mentalnu zaostalost, abnormalnosti središnjeg živčanog sustava i druge kongenitalne anomalije. U jednom slučaju molekularna kariotipizacija pokazala je patogeni gubitak jedne kopije regije 16p11.2 veličine oko 608 kb. Gubitak kopije regije 16p11.2 kod ploda obuhvaća opisanu proksimalnu regiju s točkama loma BP4-BP5 (uključujući gen TBX6) i opisuje se kao proksimalni 16p11.2 mikrodelecijski sindrom (MIM#611913). Dodatno, kod ploda s izodicentrikom 20p, aCGH metodom je nađen i patogeni gubitak jedne kopije regije 18p11.32-11.31 veličine 2,8 Mb, a koja uključuje i heterozigotnu deleciju cijelog gena *TGIF1*, čime se i objašnjava prisutnost fetalne holoprocencefalije. Mogući udruženi klinički značaj mozaičnog oblika izokromosoma 20q ne može se isključiti. Kod ostalih šest pacijentica dobivene varijante klasificirane su prema smjernicama kao varijante nepoznatog značenja, a bile su veličine od 220 kb do 3,6 Mb. Kod pet VUS promjene su bile roditeljskog podrijetla, dok je jedan *de novo* slučaj.

Submikroskopske patološke promjene broja kopija koje nisu detektirane klasičnom citogenetskom analizom, već samo aCGH metodom nađene su u

Tablica 3. Prikaz dijagnostičkih ishoda trudnoća s visokorizičnim NIPT-om

| Tip genomskog poremećaja | Broj visokorizičnih NIPT nalaza (CVS + amniocenteza) | Dijagnostička potvrda | pozitivna prediktivna vrijednost PPV (%) |
|--|--|-----------------------|--|
| T21 | 114 | 110 | 96,5 |
| T18 | 17 | 13 | 76,5 |
| T13 | 13 | 6 | 46,2 |
| 45,X | 8 | 1* | 12,5 |
| 47,XXY | 4 | 4 | 100 |
| 47,XXX | 1 | 1 | 100 |
| Inkonkluzivan za spolne kromosome | 7 | 1** | 14,3 |
| Rijetki autosomni numerički poremećaji | 7 | 1 (T8) | 14,3 |
| Strukturni CNV-ovi | 15 | 2 | 13,3 |
| neinformativan | 15 | 0 | 0 |

*mozaicizam 45,X/46,XX **nepodudaranje fenotipskog i genotipskog spola, ***trisomija 8 u mozaičnom obliku detektirana aCGH metodom



2,17 % (7/322) trudnoća. Ako isključimo trudnice koje imaju poznate genetske mutacije u obitelji (n=40), dijagnostički prinos metode aCGH iznosi 2,48 % (7/282). Kod trudnoća s prisutnim ultrazvučnim malformacijama i normalnim kariotipom dijagnostički prinos je nešto veći i iznosi 3,1 % (5/159). Udio VUS bio je 2,48 % (7/282). Od ukupno 738 uzoraka metodom aCGH utvrđeno je 4,03 % abnormalnih nalaza.

RASPRAVA

Retrospektivno istraživanje obuhvatilo je citogenomsku analizu 738 fetalnih uzoraka, 208 dobivenih biopsijom korionskih resica i 530 uzoraka plodovih voda. U 34,9 % (258/738) plodova klasičnom citogenetskom analizom nađene su strukturne i brojčane kromosomske promjene. U slučaju normalnog kariotipa i nebalansiranih strukturnih razmještanja, odnosno kod sveukupno 315 uzoraka provedena je i aCGH analiza. Prednost metode aCGH u odnosu na klasičnu citogenetsku analizu prvenstveno se odnosi na mogućnost otkrivanja citogenomskih abnormalnosti ispod razlučivosti mikroskopske analize. Stoga se kod plodova s normalnim kariotipom danas rutinski primjenjuje aCGH analiza. Studije o dijagnostičkom prinosu metode aCGH u odnosu na klasičnu kariotipizaciju pokazuju značajnu varijabilnost, koja se prven-

stveno odnosi na razliku u primjeni aCGH metode ovisno o indikaciji za invazivni zahvat te prisutnosti fetalnih ultrazvučnih biljeaga. Kod pacijentica upućenih na invazivnu dijagnostiku isključivo radi dobi majke ili anksioznosti dijagnostički prinos metode aCGH iznosi oko 0,5 % do 0,84 % (3, 4). Stosic i sur. preporučuju aCGH analizu kao opcionalnu u slučaju urednog kariograma i kod trudnica s indikacijom kao što su starija dob majke, anksioznost ili povišen rizik dobiven biokemijskim probirom iz krvi majke (6). U studijama gdje se aCGH analiza provodila kod svih trudnica s normalnim fetalnim kariotipom dijagnostički prinos iznosio je oko 1 %-2,5 % (1, 11). U našem istraživanju, gdje je aCGH metoda korištena kod trudnica s normalnim fetalnim kariotipom, a upućenih na invazivni zahvat zbog različitih indikacija, dijagnostički prinos iznosio je 2,48 %. Slični rezultati nalaze se u studijama Callaway i sur. i Wapner i sur. u kojima su klinički značajni CNV-ovi nađeni u 1,5 % i 2,5 % analiza (1, 12). Viši dijagnostički prinosi nalaze se u trudnica s ultrazvučnim abnormalnostima ploda pri čemu se patogeni CNV-ovi nalaze se u oko 6 % do 7 % plodova s normalnim kariotipom (1, 6, 12). Preglednom studijom koja je obuhvatila 18 istraživanja de Wit i sur. navode dijagnostički prinos metode aCGH u rasponu od 3,1 % do 7,9 % u plodova s izoliranim ultrazvučnim abnormalnostima, ovisno o tipu anomalija uključenom u studiju, te pri-

nosom od 9,1 % u plodova s višestrukim abnormalnostima (5). Viši dijagnostički prinos (3,1 %) dobiven je i u našoj studiji. S obzirom na značajan udio trudnoća u kojem se aCGH analizom utvrdi genomski uzrok abnormalnog fenotipa, zaključuje se kako aCGH metoda ima značajnu dijagnostičku i prognostičku vrijednost u trudnoćama s ultrazvučnim abnormalnostima.

Međutim, u velikom broju trudnoća primjenom klasične kariotipizacije i aCGH analize ne utvrdi se genetski uzrok anomalija ploda. Posljednjih godina u svrhu otkrivanja genetskih uzroka fetalnih ultrazvučnih abnormalnosti primjenjuje se metoda egzomskog sekvenciranja (ES) – cjeloegzomskog sekvenciranja (WES, engl. *Whole Exome Sequencing*), kliničkog egzoma ili genskih panela, pri čemu se provodi trio-analiza, odnosno analiza fetalnog uzorka paralelno s uzorcima krvi roditelja. Dijagnostički prinos metode ES nalazi se u rasponu od 8,5 % do 35 % (13, 14). Analizom 1618 prenatalnih uzoraka s normalnim kariotipom i rezultatima aCGH analize, Fu i sur. WES analizom postavljaju dijagnozu u 14,2 % plodova s malformacijama, pri čemu se najviši dijagnostički prinos nalazi u plodova sa skeletnim anomalijama (30,4 %) i višeorganskim abnormalnostima (25,9 %) (13). Slične rezultate nalazimo i u studiji Diderich i sur. koji su primjenom prenatalnog egzomskog panela koji je uključivao 3400 gena, analizom 629 uzoraka patogene i vjerojatno patogene varijante našli kod 14 % plodova s ultrazvučnim abnormalnostima (15). Iz studije su isključene trudnoće s izoliranom VP kao jedinim ultrazvučnim markerom, a kod kojih je provedeno sekvenciranje nove generacije (NGS, engl. *Next Generation Sequencing*) primjenom panela koji uključuje skupinu gena vezanih uz rasopatije. Istraživanjem dijagnostičkog prinosa aCGH metode kod plodova s izoliranom VP, Egloff i sur. od ukupno 720 analiziranih uzoraka u 16,8 % slučajeva nalaze najčešće aneuploidije, u 5,1 % strukturne abnormalnosti uočljive klasičnom kariotipizacijom te u 2,7 % uzoraka klinički značajne CNV-ove detektirane samo aCGH metodom (16). Važnost dijagnostičke primjene NGS metode u slučajevima izolirane VP potvrđuju i rezultati meta-analize Pauta i sur. koje je uključivalo 11 studija (14). U plodova s izoliranom VP i normalnim nalazom klasične kariotipizacije i aCGH analize cjeloegzomskim/cjelogenomskim sekvenciranjem utvrđene su klinički značajne mu-

tacije u 4 % trudnoća, od čega se u 27 % slučajeva radilo o Noonaninom sindromu.

Prednost aCGH analize u odnosu na klasičnu kariotipizaciju odnosi se i na mogućnost definiranja podrijetla nebalansiranih strukturnih promjena kao što su marker kromosomi i nebalansirane translokacije. Metodom aCGH u takvim slučajevima dobivamo podatke o podrijetlu i veličini promjene te preciznoj poziciji i sastavu gena uključenih u deletiranu ili dupliciranu regiju, na temelju čega se procjenjuje klinička relevantnost navedene promjene te se na temelju analize kliničkih baza podataka dobivaju podatci o utjecaju promjene na fenotipska obilježja ploda. Nadalje, metoda aCGH od iznimne je važnosti za analizu točaka loma kod naoko balansiranih translokacija ili inverzija, u vidu pronalaska submikroskopskih promjena ispod razlučivosti klasične kariotipizacije. U prenatalnoj dijagnostici poseban izazov predstavljaju *de novo* promjene kod kojih rizik pojave kongenitalnih anomalija i neurorazvojnih poremećaja iznosi oko 6 % (17). U našem istraživanju analizom 12 slučajeva balansiranih translokacija nisu nađeni patogeni CNV-ovi u područjima točaka loma. Halgren i sur. aCGH analizom prenatalnih uzoraka kod 32 nositelja naoko balansiranih strukturnih razmještanja također ne nalaze patogene CNV (18). Autori sugeriraju kako aCGH metoda u ovakvim slučajevima ipak ima nisku prognostičku vrijednost, posebice kada je ultrazvučni nalaz ploda normalan, te kao metodu izbora za precizno definiranje točaka loma ističu cjelogenomsko sekvenciranje.

Poseban izazov u prenatalnoj dijagnostici predstavlja interpretacija varijanti nepoznatog kliničkog značenja. Kako bi se smanjio broj prijavljenih VUS Armour i sur. preporučuju graničnu vrijednost od 500 kb za prijavljivanje delecija i 1 Mb za duplikacije (19). Ipak, interpretacija i prijavljivanje CNV ovisi i o genomskoj poziciji i sadržaju gena te se ne može u obzir uzimati samo veličina promjene. U ovom istraživanju VUS su nađeni u 2,48 % trudnoća s normalnim kariotipom te su bili veličine od 220 kb do 3,6 Mb.

ZAKLJUČAK

Povećanje dijagnostičkog prinosa od oko 3 % do 6 %, u prenatalnoj dijagnostici citogenomskih poremećaja pokazuje da aCGH metoda treba biti dio

standardnog testiranja kod trudnica koje su upućene na invazivnu dijagnostiku zbog ultrazvučnih abnormalnosti ploda, bilo kao prvi test ili kao dodatna analiza nakon provedene kariotipizacije (20, 21). No, aCGH metodom ne mogu se utvrditi balansirana strukturna razmjesta, triploidije te mozaicizmi s niskim udjelom kromosomski abnormalnih stanica. Stoga, unatoč brojnim prednostima u usporedbi s klasičnom citogenetskom analizom, tehnika aCGH ne može u potpunosti zamijeniti klasičnu kariotipizaciju. Primjenom klasične kariotipizacije i metode aCGH još uvijek se kod značajnog broja plodova sa strukturnim anomalijama ne otkrije uzrok, što se može dijelom riješiti uvođenjem cjeloegzomskog i cjelogenomskog sekvenciranje u prenatalnu dijagnostiku. Otkrivanje patogenih varijanti na razini gena omogućit će otkrivanje genetskih uzroka i određivanje reproduktivnih rizika, a time odgovarajuće savjetovanje i bolju personaliziranu skrb trudnica.

Kratice:

- CNV – varijante broja kopija (engl. *copy number variations*)
- aCGH – komparativna genomska hibridizacija na mikropostroju (engl. *array comparative genomic hybridization*)
- SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)
- VUS – varijanta nepoznatog značenja (engl. *variant of uncertain significance*)
- CVS – biopsija korionskih resica (engl. *chorionic villus sampling*)
- NIPT – neinvazivni prenatalni test probira
- VP – vratna prozirnost (engl. *nuchal translucency*)
- DV – duktus venosus
- FISH – Fluorescentna *in situ* hibridizacija (engl. *fluorescence in situ hybridization*)
- ES – eksomsko sekvenciranje
- NGS – sekvenciranje nove generacije (engl. *next-generation sequencing*)

LITERATURA

1. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012;367(23):2175–2184. doi: 10.1056/NEJMoa1203382.
2. Scott SA, Cohen N, Brandt T, Toruner G, Desnick RJ, Edelman L. Detection of low-level mosaicism and placental mosaicism by oligonucleotide array comparative genomic

hybridization. *Genet Med.* 2010;12(2):85–92. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181cc75d0.

3. Fiorentino F, Napoletano S, Caiazzo F, et al. Chromosomal microarray analysis as a first-line test in pregnancies with a priori low risk for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(7):725–730. doi: 10.1038/ejhg.2012.253.
4. Srebnik MI, Joosten M, Knapen MFCM, et al. Frequency of submicroscopic chromosomal aberrations in pregnancies without increased risk for structural chromosomal aberrations: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018;51(4):445–452. doi: 10.1002/uog.17533.
5. de Wit MC, Srebnik MI, Govaerts LC, Van Opstal D, Galjaard RJ, Go AT. Additional value of prenatal genomic array testing in fetuses with isolated structural ultrasound abnormalities and a normal karyotype: a systematic review of the literature. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;43(2):139–146. doi: 10.1002/uog.12575.
6. Stosic M, Levy B, Wapner R. The use of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2018;45(1):55–68. doi: 10.1016/j.ogc.2017.10.002.
7. Shi X, Tang H, Lu J, Yang X, Ding H, Wu J. Prenatal genetic diagnosis of omphalocele by karyotyping, chromosomal microarray analysis, and exome sequencing. *Ann Med.* 2021;53(1):1285–1291. doi: 10.1080/07853890.2021.1962966.
8. Committee on Genetics and the Society for Maternal-Fetal Medicine. 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(6):e262–e268. doi: 10.1097/AOG.0000000000001817.
9. Hastings R, Howell R, Bricarelli FD, Kristoffersson U, Cavani S. General guidelines and quality assurance for cytogenetics. E.C.A. – European Cytogeneticists Association Newsletter. 2012;29. Available from: <https://www.e-c-a.eu/en/GUIDELINES.html>
10. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, 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.* 2020;22(2):245–257. doi: 10.1038/s41436-019-0686-8.
11. Chong HP, Hamilton S, Mone F, et al. Prenatal chromosomal microarray testing of fetuses with ultrasound structural anomalies: a prospective cohort study of over 1000 consecutive cases. *Prenat Diagn.* 2019;39(12):1064–1069. doi: 10.1002/pd.5545.
12. Callaway JL, Shaffer LG, Chitty LS, Rosenfeld JA, Crolla JA. The clinical utility of microarray technologies applied to prenatal cytogenetics in the presence of a normal conven-

- tional karyotype: a review of the literature. *Prenat Diagn.* 2013;33(12):1119–1123. doi: 10.1002/pd.4209.
13. Fu F, Li R, Yu Q, et al. Application of exome sequencing for prenatal diagnosis of fetal structural anomalies: clinical experience and lessons learned from a cohort of 1618 fetuses. *Genome Med.* 2022;14(1):123. doi: 10.1186/s13073-022-01130-x.
 14. Pauta M, Martinez-Portilla RJ, Borrell A. Diagnostic yield of next-generation sequencing in fetuses with isolated increased nuchal translucency: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2022;59(1):26–32. doi: 10.1002/uog.23746.
 15. Diderich KEM, Bruggenwirth HT, Joosten M, et al. The high diagnostic yield of prenatal exome sequencing followed by 3400 gene panel analysis in 629 ongoing pregnancies with ultrasound anomalies. *Prenat Diagn.* 2024;44(12):1444–1450. doi: 10.1002/pd.6676.
 16. Egloff M, Hervé B, Quibel T, et al. Diagnostic yield of chromosomal microarray analysis in fetuses with isolated increased nuchal translucency: a French multicenter study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018;52(6):715–721. doi: 10.1002/uog.18928.
 17. Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* 1991;49(5):995–1013.
 18. Halgren C, Nielsen NM, Nazaryan-Petersen L, et al. Risks and recommendations in prenatally detected de novo balanced chromosomal rearrangements from assessment of long-term outcomes. *Am J Hum Genet.* 2018;102(6):1090–1103. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.04.005.
 19. Armour CM, Dougan SD, Brock JA, et al.; On behalf of the Canadian College of Medical Geneticists. 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):215–221. doi: 10.1136/jmedgenet-2017-105013.
 20. Mitrakos A, Kosma K, Makrythanasis P, Tzetzis M. Prenatal chromosomal microarray analysis: does increased resolution equal increased yield? *Genes.* 2023;14(8):1519. doi: 10.3390/genes14081519.
 21. Wójtowicz A, Kowalczyk K, Szewczyk K, et al. Array comparative genomic hybridization (aCGH) results among patients referred to invasive prenatal testing after first-trimester screening: a comprehensive cohort study. *Diagnostics.* 2024;14(19):2186. doi: 10.3390/diagnostics14192186.

Adresa za dopisivanje:

Dr.sc. **Ana Mustapić**, mag.biol.mol.

Odjel za laboratorijsku citogenetiku, Klinika za ginekologiju i porodništvo

Klinička bolnica „Sveti Duh“

Sveti Duh 64, 10000 Zagreb

e-mail: avicic@kbsd.hr

S U M M A R Y

Diagnostic contribution of comparative genomic hybridization on microarrays in prenatal detection of genomic disorders

Feodora Stipoljev, Maja Oroz, Tomislav Hafner, Ivanka Bekavac Vlatković,
Damir Zudenigo, Ratko Matijević, Tamara Vuk, Ana Mustapić

The aim of the study was to determine the diagnostic yield of array comparative genomic hybridization (aCGH) in detecting submicroscopic changes, as well as the occurrence of variants of uncertain significance (VUSs).

Methods included a retrospective results analysis obtained from various cytogenomic techniques on a total of 738 samples obtained by chorionic villus sampling and amniocentesis. Indications for invasive procedures included abnormal fetal ultrasound, high-risk biochemical or non-invasive screening tests, and a positive medical history for genomic disorders. Karyotyping was performed on all samples. aCGH analysis was conducted on 78 chorionic villi samples and 259 amniotic fluid samples with normal karyotype or unbalanced structural rearrangements.

Results: Among women referred for chorionic villus sampling and amniocentesis, numerical and structural chromosomal aberrations were found in 56 % and 27 % of cases, respectively. Numerical chromosomal abnormalities were detected in 32 % of fetuses, with the highest proportion of trisomy 21 and 18. Unbalanced structural rearrangements of parental origin were found in 19 fetuses, while balanced reciprocal and Robertsonian translocations were identified in 14 cases. Copy number variants (CNVs) in fetuses with a normal karyotype were found in 14 cases, of which seven were classified as pathogenic and seven as VUS. Submicroscopic pathological changes, as well as VUSs, were detected in 2.48 % of cases.

Conclusions: The use of aCGH in prenatal diagnostics has increased the diagnostic yield for CNV detection. However, a significant number of abnormalities remain undetected, particularly in fetuses with multiple malformations, suggesting the implementation of next-generation sequencing into standard practice.

Key words: PRENATAL DIAGNOSIS; COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION;
ULTRASONOGRAPHY; CONGENITAL ABNORMALITIES