ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА MLPA ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАСПРОСТРАНЕННЫХ АНЕУПЛОИДИЙ В ОБРАЗЦАХ АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ И БИОПТАТА ВОРСИН ХОРИОНА

Требка Е.Г., Спивак Е.А.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Беларусь, г. Минск

Цель Оценить конкордантность результатов MLPA и стандартного кариотипирования при пренатальной диагностике распространённых анеуплоидий в образцах амниотической жидкости и ворсин хориона и определить место MLPA в алгоритме пренатальной диагностики хромосомной патологии в Республике Беларусь

Материалы и методы Исследования проводились на образцах амниотической жидкости (АЖ) и ворсин хориона (БВХ) с использованием методов стандартного кариотипирования (СК) и MLPA (SALSA MLPA Probemix P095) (ГУ РНПЦ «Мать и дитя», Республика Беларусь).

Актуальность В Республике Беларусь пренатальная диагностика хромосомной патологии (ХП) проводится с 1990 г. с использованием метода СК (GTG) при установлении высокого риска по ХП по результатам пренатального скрининга. Интеграция молекулярно-генетических экспресс-методов в действующие алгоритмы диагностики ХП с учетом использования их преимуществ и возможностей позволяет повысить качество оказания медико-генетической помощи при подозрении на ХП у плода. В международной практике в качестве пренатальной экспресс-диагностики распространенных анеуплоидий наиболее широко применяются коммерческие тест-системы MLPA (Россия, Китай, страны Европы, Израиль, Турция, Марокко, Австралия и др.).

Результаты и обсуждение

Метод MLPA в отличие от СК является таргетным и применяется для диагностики наиболее частых анеуплоидий: трисомий 21/18/13 хромосом и численной патологии половых хромосом. Значительными преимуществами MLPA являются существенное сокращение времени диагностики частой ХП у плода и возможность потокового тестирования большого числа образцов в централизованной лаборатории. Сравнительная характеристика методов MLPA и СК в пренатальной диагностике ХП представлена в таблице. Согласно данным СК в ГУ РНПЦ «Мать и дитя» в 2005/2010/2015/2020/2025гг. трисомии 21/18/13 хромосом являются самой частой ХП в БВХ и АЖ (рис.1).

Таблица Сравнительная характеристика методов MLPA и СК

MLPA	СК
Анализ проводится на нативном материале	Требуется культивирование и получение метафазных клеток
Количество нативной АЖ для метода 2-5 мл	Количество нативной АЖ для метода более 10 мл
Высокая пропускная способность/ автоматизация	Низкая пропускная способность/ трудоемкое исследование опытным цитогенетиком
Срок выдачи ответа 3-7 дней	Срок выдачи ответа 14-28 дней (АЖ, БВХ длительная культура), 1-2дня (БВХ п/прямой метод)
Анализ анеуплоидий 21, 18, 13, половых хромосом	Анализ кариотипа
Анализ мозаицизма более 20-30%	Анализ мозаицизма (уровень мозаицизма зависит от числа первичных колоний и проанализированных клеток (подсчет 25 клеток позволяет анализировать 12 % уровень мозаицизма с доверительным уровнем 0,95, Е. В. Hook, 1977)
Экспресс-тест анеуплоидий 21, 18, 13, половых хромосом	«Золотой стандарт» для полного хромосомного анализа

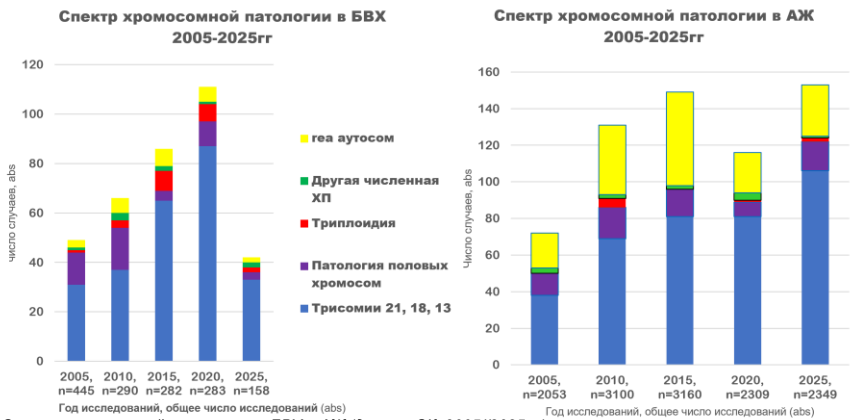


Рис.1 Спектр хромосомной патологии в БВХ и АЖ (данные СК, 2005//2025гг)

За период 03.2025-03.2026г всего на исследование методом MLPA было направлено 242 образца: 12 образцов БВХ, 225 образцов АЖ, 5 абортированных образцов. Основаниями для экспресс-диагностики ХП методом MLPA были: высокий риск по результатам комбинированного скрининга или НИПТ, УЗ маркеры ХП, многоводие/маловодие (вследствие изначально низкого порога концентрации клеток для культивирования для метода СК), поздние сроки беременности и др. В 7 из 225 случаев АЖ (3,1%) метод MLPA применялся как альтернативный метод диагностики ХП при неудачном культивировании клеток и неинформативном результате СК. В данных случаях причинами послужили:

- отсутствие роста клеток АЖ in vitro;
- микробная контаминация культуры клеток АЖ;
- отсутствие метафазных клеток, пригодных для анализа кариотипа;
- неоднозначный ответ по СК (?mos).

Представленные на рис.2,3. структура направлений на MLPA по областям Беларуси и высокая доля образцов АЖ более 19 недель (50%) на момент проведения амниоцентеза свидетельствуют о высокой востребованности в экспресс-диагностике частых анеуплоидий у плода пренатальных центров в поздние сроки беременности. В 19,8% (48/242) случаев была установлена ХП. Наиболее частой анеуплоидией была трисомия 21 хромосомы – установлена в 37 образцах (37/48, 77%). Спектр выявленной ХП представлен на рис.4.



Рис.2 Структура направлений на MLPA по областям РБ

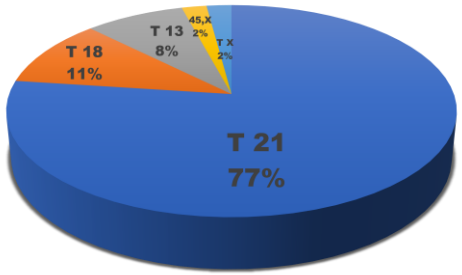


Рис.4 Спектр установленных анеуплоидий методом MLPA
**T - трисомия*

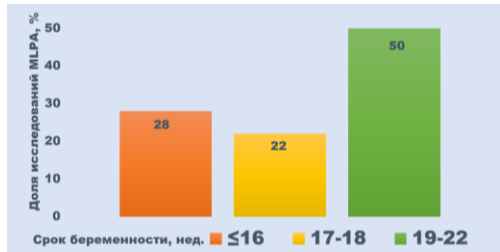


Рис.3 Распределение направлений образцов АЖ на исследование MLPA в зависимости от срока беременности

В 230 пренатальных случаях исследования проводились двумя методами: MLPA на нативном материале (результат был получен в течение 3-7 дней) и СК (результат был получен в течение 2-4 недель в зависимости от темпов роста культуры). Во всех случаях (100%) результат исследования распространенных анеуплоидий методом MLPA соответствовал результату СК пренатальных культур.

Выводы

Внедрение экспресс-исследований частых анеуплоидий в пренатальную диагностику ХП обусловлено:

- высокой долей трисомий 21, 18, 13 хромосом и численной патологии половых хромосом в структуре диагностируемой ХП в пренатальных образцах с повышенным и высоким риском по ХП в Республике Беларусь,
- высокой результативностью выявления целевых анеуплоидий методом MLPA (SALSA MLPA Probemix P095): диагностическая точность проведенных исследований MLPA для целевых хромосом является сопоставимой с «золотым стандартом» методом СК – в проведенном исследовании конкордантность полученных результатов MLPA и СК составила 100%,
- существенным сокращением времени диагностики самых частых анеуплоидий (до 3-7 дней для MLPA против 14-28 дней для СК) с учетом сроков беременности и пороков развития у плода, что критично для решения вопроса о последующем ведении беременности.

В ходе проведенного исследования установлена целесообразность создания комбинированных алгоритмов с использованием возможностей и ограничений цитогенетического и молекулярно-генетических методов, которые способствуют оптимизации и повышению эффективности лабораторной пренатальной диагностики ХП. MLPA может быть рекомендован как экспресс-метод первой линии для диагностики частых анеуплоидий (13, 18, 21, X, Y) в комбинации с СК, которое позволяет диагностировать также другие типы ХП: триплоидию, численную патологию нецелевых для MLPA хромосом, структурную патологию хромосом и мозаичные кариотипы (в пределах разрешения метода).