

## PRIMJENA MIKROSATELITSKIH LOKUSA U PRENATALNOJ DIJAGNOSTICI NAJČEŠĆIH ANEUPLOIDIJA

KRISTINA CRKVENAC GORNIK<sup>1</sup>, ZORANA GRUBIĆ<sup>2</sup>, IVANA TONKOVIĆ ĐURIŠEVIĆ<sup>1</sup>,  
DUBRAVKA MUŽINIĆ<sup>1</sup>, DAVOR BEGOVIĆ<sup>1</sup>, VESNA KERHIN BRKLJAČIĆ<sup>2</sup>

*Dug i vrlo složen laboratorijski postupak je glavni nedostatak metode klasične citogenetike u otkrivanju kromosomskih poremećaja. Primjena PCR-STR (Short Tandem Repeat) metode u analizama satelitske DNA u različitim poljima biologije i medicine otvorila je mogućnost primjene i u prenatalnoj dijagnostici. Ciljevi ovog rada bili su istražiti mogućnost primjene lokusa STR u prenatalnoj dijagnostici najčešćih aneuploidija; usporediti rezultate dobivene metodom PCR-STR s metodom klasične citogenetike, te po prvi put u Hrvatskoj uvesti metodu PCR-STR u prenatalno pretraživanje plodovih voda. Usporedba dvije metode na 22 uzorka plodovih voda pokazala je 100% podudaranje rezultata (3 uzoraka s trisomijom kromosoma 18, 19 uzoraka s trisomijom kromosoma 21). Prenatalnim pretraživanjem 105 uzoraka plodovih voda otkriveno je kod 6 (5,7%) uzoraka promjena u broju kromosoma (1 trisomija kromosoma 18, 4 trisomije kromosoma 21, te jedna triploidija). Rezultati su bili poznati 4. dan nakon uzimanja uzoraka plodovih voda. Zaključno možemo reći da je PCR-STR brza, pouzdana i jednostavna metoda s većom informativnošću i preciznošću od metoda klasične citogenetike.*

Deskriptori: PCR-STR, ANEUPLOIDIJE, PRENATALNA DIJAGNOSTIKA

### UVOD

Metode klasične citogenetike za otkrivanje kromosomskih poremećaja zahtijevaju duge laboratorijske testove, a time i duži vremenski period za dobivanje rezultata. Kod postavljanje same dijagnoze koriste se in vitro kulture limfocita, amniocita ili stanica horionskih resica. Navedeni testovi također nisu pogodni ni za skrining velikog broja trudnica. Iz tog razloga javila se potreba za uvođenjem novih metoda, kako bi se u što kraćem vremenu dobili rezultati. Otkriće i primjena ponavljajućih sekvenci DNA, lokusa STR (Short Tandem Repeat), u

drugim granama medicine dovelo je do njihove primjene i u području citogenetike. Mikrosatelitski lokusi ili lokusi STR, kratka uzastopna ponavljanja, sastoje se od ponavljajućih sekvenci dužine 2-6pb, a javljaju se svakih 6 kb uzduž genoma (1). Razlikujemo mono-, di-, tri-, tetra i pentanukleotidna ponavljanja. Navedeni lokusi nalaze se u izvangenskim, ali i u genskim regijama i to ne samo u intronima, već i u kodirajućim regijama, tj. eksonima. Mikrosatelitska DNK je slabo zastupljena jedino u telomernim i centromernim regijama (2).

Zbog svoje rasprostranjenosti duž cijelog genoma, visokog stupnja raznolikosti i relativno jednostavnih metoda njihovog određivanja, lokusi STR se sve više koriste u genskom mapiranju, populacijskoj genetici, "linkage" analizama, evolucijskim studijama, sudskoj medicini, transplantacijskoj medicini, te u prenatalnoj dijagnostici.

Prvi radovi o primjeni lokusa STR u prenatalnoj dijagnostici vezani su uz 1993. godinu kada je grupa engleskih

autora izvijestila o primjeni lokusa STR u dijagnostici aneuploidija (3). Naime, zdrave osobe mogu biti heterozigoti za pojedini lokus STR (dva različita alela s njihovim međusobnim omjerom 1:1) i homozigoti (samo jedan alel) (Slika 1.a i 1.b). S druge strane, osobe s trisomijom mogu imati ili tri različita alela (Slika 2.a) s omjerom veličine 1:1:1 (trisomija s tri alela) ili dva alela (Slika 2.b) od kojih jednog alela ima dvostruko više nego drugog 2:1 (trisomija s dva alela).

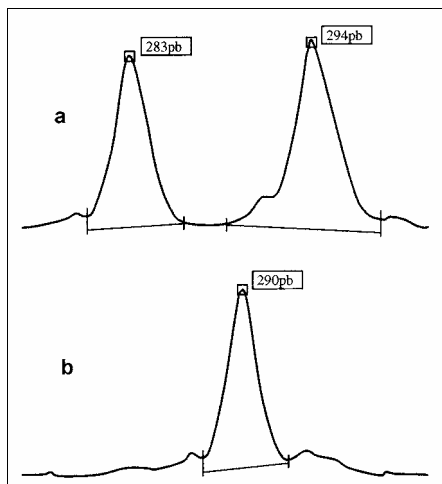
Unatoč mnoštvu radova o primjeni analize lokusa STR u citogenetici, postoje i brojne teškoće (4). Naime, problemi su vezani uz standardizaciju protokola kao i izbor mikrosatelita koji će biti korišteni u analizama. Iz tih razloga primjena lokusa STR u citogenetici u ovom trenutku nije u potpunosti zamijenila klasične metode. Pretpostavka je da će tako biti sve do trenutka kada će se usvojiti standardni protokoli, koji će se temeljiti na optimalnom broju i rasporedu mikrosatelita na svakom pojedinom kromosomu, odgovornom za određeni sindrom. Međutim, unatoč brojnim poteškoćama nužno je uvođenje ove

<sup>1</sup> Zavod za genetiku i bolesti metabolizma  
Klinika za pedijatriju

<sup>2</sup> Zavod za tipizaciju tkiva  
Klinika za urologiju

Klinički bolnički centar Zagreb

Adresa za dopisivanje:  
Mr. sc. Kristina Crkvenac Gornik  
Dipl. ing. Biologije  
Zavod za genetiku i bolesti metabolizma  
Klinika za pedijatriju  
Klinički bolnički centar Zagreb  
10000 Zagreb, Kišpatičeva 12



Slika 1.  
Prikaz zdravih osoba analiziranih za alele lokusa D18S51  
a - osoba heterozigot za alele lokusa D18S51;  
b - osoba homozigot za alele lokusa D18S51

Figure 1  
Presentation of healthy persons analysed for allele loci D18S51  
a - heterozygous person for allele loci D18S51  
b - homozygous person for allele loci D18S51

metode u rutinsku dijagnostiku svakog citogenetskog laboratorija, a s ciljem dobivanja rezultata u što kraćem vremenu. Također u pojedinim slučajevima, moguće je dobivanje više genskih informacija (npr. kod uniparentalne disomije može se točno utvrditi od kojeg roditelja je plod naslijedio oba kromosoma) (5).

Cilj ovog rada bio je razviti protokol za primjenu analize lokusa STR kao klasične metode u prenatalnoj dijagnostici najčešćih aneuploidija, usporediti rezultate analize dobivene klasičnom citogenetikom s rezultatima mikrosatelitskih analiza, te napraviti skrining (pretraživanje) uzoraka plodovih voda trudnica kojima su indikacije za prenatalnu dijagnostiku bile životna dob, ultrazvučna sumnja i povišeni rizik za Downov sindrom utvrđen triple testom.

## MATERIJALI I METODE

### Ispitanici

Tijekom godine dana u Zavodu za genetiku i metabolizam, Klinike za pedijatriju, KBC-Zagreb, analizirano je 734 uzoraka plodove vode. Kod 22 uzorka nađena je aneuploidija (trisomija kromosoma 21 i 18), uzorci su dalje

testirani za polimorfizam lokusa STR. U svrhu prenatalnog skrininga ispitali smo 105 uzoraka plodove vode trudnica koje su bile upućene u Zavod za genetiku i metabolizam, bilo zbog dobi, ultrazvučne sumnje ili povišenog rizika za Downov sindrom određenog triple testom.

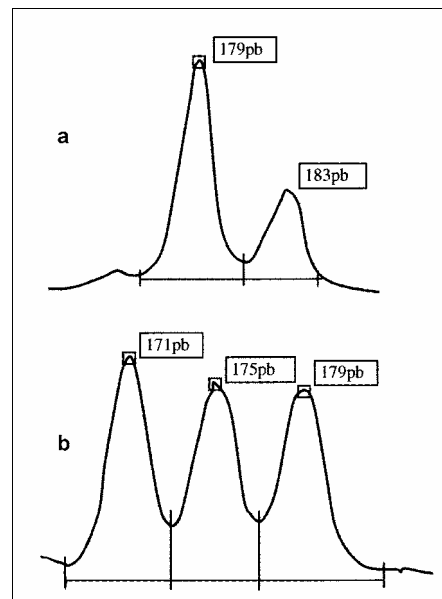
### Metode

Iz uzoraka krvi i plodovih voda izolirali smo DNA metodom izsoljavanja 6M NaCl-om ili korištenjem kita za izolaciju DNA (NucleoSpin, Macherey-Nagel-Duren, Njemačka) (6). Lančana reakcija polimerazom ili PCR (Polymerase Chain Reaction) reakcija (15  $\mu$ l) sadržavala je slijedeće sastojke: (1,25  $\mu$ l) PCR pufer s MgCl<sub>2</sub>, (0,125  $\mu$ l) deoksiribonukleozid trifosfat (dATP, dGTP, dCTP i dTTP), (0,250  $\mu$ l) 5' i 3' klice, (0,125  $\mu$ l) Taq polimerazu, (9,5  $\mu$ l) deioniziranu vodu i (3  $\mu$ l) uzorak DNK. Uvjeti PCR reakcija bili su kao što je navedeno u radovima drugih autora (11-13). Testirani lokusi STR za kromosom 18 bili su: D18S51, D18S535 i D18S858, a za kromosom 21: D21S1411, D21S1414 i D21S1435. Korišteni lokusi STR bili su izabrani na temelju njihove informativnosti (broj homozigotnih osoba veći od 75%) koja je uočena prethodnim populacijskim istraživanjima provedenim u Hrvatskoj (7). Zbog detekcije laserom u automatskom sekvenceru sve 5' klice obilježene su fluorescentnom bojom Cy-5 na svom 5' kraju.

Elektroforeza uzoraka provedena je u automatskom laser sekvenceru DNK (ALFexpress, Pharmacia-Uppsala, Švedska) na 6% poliakrilamidnom gelu. Za analizu dužine alela koristili smo program "FragmentManager" (Pharmacia), kao kontrolu koristili smo na svakom gelu po dva interna size markera te jedan komercijalni sizer.

## REZULTATI

Usporedba rezultata analize lokusa STR i klasične citogenetike u otkrivaju trisomija kromosoma 18 i 21. Od ukupno 734 uzoraka plodove vode, kod tri uzorka metodom klasične citogenetike određena je trisomija kromosoma 18, te kod 19 uzoraka trisomija kromosoma 21. Uzorci s



Slika 2.  
Prikaz osoba s trisomijom kromosoma 21 analiziranih za alele lokusa D21S1435

a - osoba s dvostrukom dozom jednog alela (2:1) u odnosu na drugi alel na lokusu D21S1435

b - osoba s tri različita alela (1:1:1) na lokusu D21S1435

Figure 2  
Presentation of persons with trisomy of chromosome 21 analysed for alleles on loci D21S1435

a - person with double dose of one allele (2:1) compared with other allele on loci D21S1435

b - person with three different alleles (1:1:1) on loci D21S1435

trisomijom dalje su analizirani za 3 lokusa STR na kromosomu 18 (D18S51, D18S535, D18S858) i 3 lokusa STR na kromosomu 21 (D21S1411, D21S1414, D21S1435). Iz tablice 1. (a i b) vidljivo je da su kod sva 3 uzorka s trisomijom 18 na lokusima D18S51 i D18S535 dobiveni informativni rezultati, što govori da su uočena 3 različita alela ili dvostruka doza jednog alela u odnosu na drugi alel. Locus D18S858 nije bio informativan za jedan uzorak. Naime, analizom uzorka uočen je samo jedan alel dok je kod preostala 2 uzorka i ovaj locus bio informativan.

Svih 19 uzoraka prikazanih u Tablici 1.b kod kojih je klasičnom citogenetikom određena trisomija kromosoma 21 uspješno je analizirano za polimorfizam lokusa D21S1435. Za svih 19 uzoraka locus D21S1435 bio je informativan, dok locus D21S1411 nije

Tablica 1

Analiza uzoraka plodovih voda s trisomijom kromosoma 18 i kromosoma 21

Table 1

Analysis of amniotic fluid samples with trisomy of chromosome 18 and chromosome 21

a) trisomija kromosoma 18 (N=3)	D18S51	D18S535	D18S858
1:1:1	2	1	1
2:1	1	2	1
N.I.	0	0	1

b) trisomija kromosoma 21 (N=19)	D21S1411	D21S1414	D21S1435
1:1:1	8	14	11
2:1	8	5	8
N.I.	3	0	0

1:1:1 - tri različita alela; 2:1 - dva različita alela od kojih jedan alel ima dvostruko veći signal u odnosu na drugi alel; N.I. - nije informativan

bio informativan za 3 uzorka. Međutim, analizom preostala dva lokusa STR dobiveni su informativni rezultati. Lokus D21S1414 je u svim uzorcima bio informativan, kod 14 uzoraka uočili smo tri različita alela, a preostalih 5 uzoraka pokazalo dvostruku dozu jednog od dva nađena alela na ovom lokusu.

### Pretraživanje plodovih voda

Primjenom analize lokusa STR proveden je prenatalni skrining 105 uzoraka plodovih voda. Kod 5 (4,76%) uzoraka otkrivena je promjena u broju kromosoma: jedna trisomija kromosoma 18, četiri trisomije kromosoma 21 i jedna triploidija. Iz rezultata prikazanih

u Tablici 2. vidimo da su kod trisomije kromosoma 18 sva tri lokusa STR (D18S51, D18S535, D18S858) bila informativna i pokazala ili 3 različita alela ili dvostruku dozu jednog alela u usporedbi s drugim uočenim alelom. Sva 3 lokusa STR na kromosomu 21 ukazivala su na normalan nalaz tj. postojanje dva alela istog intenziteta signala. Trisomiju kromosoma 21 otkrili smo kod 4 uzorka, tri uzorka su pokazala patološki nalaz na sva tri lokusa STR kromosoma 21 (D21S1411, D21S1414, D21S1435), dok je za jedan uzorak informativan bio samo lokus D21S1414. Ova 4 uzorka su na lokusima STR na kromosomu 18 pokazala, kako normalan broj alela (dva ili jedan), tako i omjer njihovih signala (1:1). Prenatalnim pretraživanjem jednog uzorka otkrili smo po 3 tri različita alela na 4 testirana lokusa STR (D18S51, D18S535, D21S1414, D21S1435), zatim dvostruku dozu jednog od dva uočena alela na lokusu D18S858, dok je lokus D21S1411 bio neinformativan (samo jedan alel). Nalaz nas je naveo na sumnju o postojanju triploidije, koja je kasnije i dokazana klasičnom citogenetikom.

Tablica 2.

Zbirni prikaz rezultata pretraživanja uzoraka plodovih voda (N=105)

Table 2

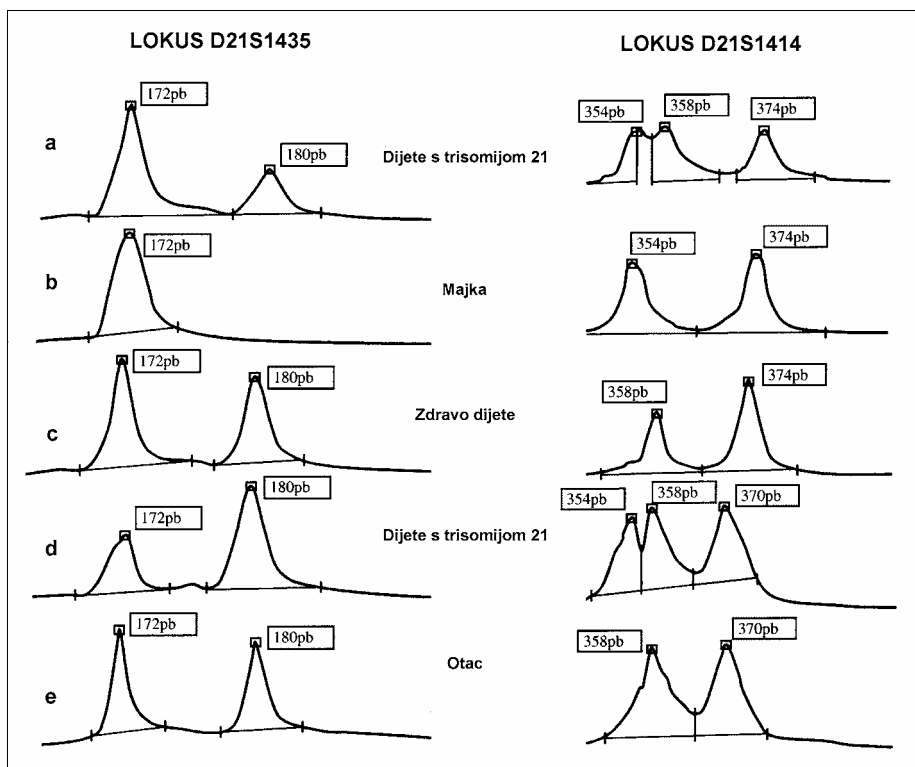
Presentation of results of amniotic fluid samples analysis (N=105)

		D18S51	D18S535	D18S858	D21S1411	D21S1414	D21S1435
Trisomija 18	1:1:1	1					
	2:1		1	1			
	1:1				1	1	1
	N.I.						
Trisomija 21	1:1:1				2	3	2
	2:1				1	1	1
	1:1	3	4	2			
	N.I.	1		2	1		1
Triploidija	1:1:1	1	1	1	1	1	1
	2:1						
	1:1						
	N.I.						

1:1:1 - tri različita alela; 2:1 - dva različita alela od kojih jedan alel ima dvostruko veći signal u odnosu na drugi alel; 1:1 - dva različita alela iste jačine signala; N.I. - nije informativan

### RASPRAVA

Primjenom analize lokusa STR kao rutinske metode u otkrivanju kromosomskih poremećaja tijekom prenatalne dijagnostike ustanovili smo nekoliko prednosti, ali i nedostataka same metode. Jedna od glavnih prednosti je vrlo brzo dobivanje rezultata što ima veliku važnost u samoj prenatalnoj dijagnostici, te pouzdanost metode. Naime, krajnji rok za medicinski indicirani pobačaj u slučaju patološkog nalaza je 25. tjedan trudnoće, a postupak vađenja plodove vode izvodi se između 16. i 20. tjedna trudnoće (u pojedinim slučajevima i kasnije). Analize klasične citogenetike zahtijevaju rad na kultiviranim stanicama plodove vode, sam postupak kultiviranja je dugotrajan i zahtjevan, te se stoga produžuje vrijeme potrebno za dobivanje nalaza (3-4 tjedna). U našim analizama mikrosatelitskih lokusa rezultati su bili dostupni već nakon 3-4 dana nakon uzimanja uzorka plodove vode, time je znatno skraćeno vrijeme za postavljanje dijagnoze. Ukoliko je kod ploda



Slika 3. Prikaz određivanja podrijetla prekobrojnog kromosoma primjenom analize lokusa STR, D21S1435 i D21S1414 u obitelji s dvoje djece s trisomijom kromosoma 21 a - bolesno dijete koje je prekobrojni kromosom 21 naslijedilo od majke; b - majka; c - zdravo dijete; d - bolesno dijete koje je prekobrojni kromosom 21 naslijedilo od oca; e - otac

Figure 3. Presentation of origin determination for additional chromosome using STR loci analysis, D21S1435 and D21S1414 in family with two children with trisomy of chromosome 21 a - sick child who inherited additional chromosome 21 from mother; b - mother; c - healthy child; d - sick child who inherited additional chromosome 21 from father; e - father

pronađena neka od aneuploidija, analizom lokusa STR može se odrediti porijeklo prekobrojnog kromosoma, te da li je do kromosomskog nerazdvajanja došlo u mejozi I ili mejozi II što nije slučaj kod testiranja klasičnom metodom pruganja (8). Primjer obitelji u kojoj je bilo moguće pomoću analize lokusa STR utvrditi podrijetlo prekobrojnog kromosoma prikazan je na Slici 3. Iz slike je vidljivo da je kod osobe A prekobrojni kromosom 21 majčinog podrijetla, dok je osoba D prekobrojni kromosom 21 naslijedila od oca.

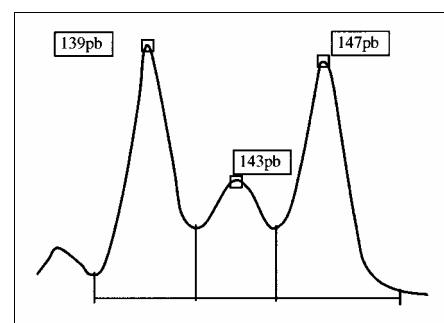
Važno je istaknuti da se analiza lokusa STR može izvoditi na vrlo maloj količini uzorka ili čak na jednoj stanici, te se stoga ova analiza može primijeniti i u preimplantacijskoj dijagnostici (9, 10). Na kraju, moramo istaknuti da za analizu PCR-STR nije važna kvaliteta i vijabilitet stanica jer se koristi stanična

DNA, te uzorak plodove vode može sadržavati degradirane ili mrtve stanice.

Međutim, unatoč brojnim i neoborivim prednostima same metode, postoje i neki nedostaci. Jedan od nedostataka vezan je uz nemogućnost utvrđivanja zagađenosti uzorka plodove vode s majčinim stanicama. Kod većine uzoraka moguće je posumnjati na kontaminaciju na osnovi samog izgleda plodove vode (krvavi uzorak), međutim ni kod uzorka plodove vode bistrog izgleda ne možemo sa sigurnošću reći da nije prisutna niti jedna majčina stanica. No, isti taj problem prisutan je i kod metoda klasične citogenetike u slučaju kada majka nosi plod ženskog spola, te nas prisutnost i analiza majčinih stanica, može navesti na krivi zaključak o zdravom plodu. Schmidt i suradnici su u svojim istraživanjima zaključili da zagađenost uzorka plodove vode s majčinom DNA nužno ne isključuje

ispravnu interpretaciju nalaza (11). Naime, nakon izolacije DNA iz uzorka plodove vode, količina DNA ploda je puno veća nego količina DNA izolirane iz eventualnih majčinih stanica. Rezultat PCR reakcije, bit će nekoliko tisuća puta veća količina umnoženog mikrosatelitskog lokusa fetusa u odnosu na količinu umnožene DNA iz eventualnih majčinih stanica. Analiza dužine i jačine signala uzorka, kontaminiranog s majčinim stanicama, u automatskom sekvenceru pokazat će postojanje vrlo male količine trećeg signala. Iz tog razloga smo u našu analizu uključili i krvave uzorke plodove vode. Rezultati dobiveni analizom krvavih uzoraka plodove vode primjenom ove metode u potpunosti su se podudarali s rezultatima dobivenim klasičnom citogenetikom.

Nužno je spomenuti, da je analiza uzoraka za trisomiju kromosoma 18 ukazala i na problem koji se može javiti primjenom mikrosatelitskih lokusa, a koji se mogu izbjeći samo pažljivom analizom svakog uzorka, te iskustvom. Za jedan uzorak je metodom klasičnog oprugavanja utvrđen mozaički oblik trisomije kromosoma 18. U uzorku je udio trisomičnih stanica bio svega 3 stanice, dok je 70 stanica imalo normalan broj kromosoma. S obzirom da je broj stanica s trisomijom bio izuzetno mali u odnosu na stanice s



Slika 4. Prikaz rezultata analize lokusa D18S858 kod osobe s mozaikom trisomije kromosoma 18. Dva alela, alel 11 (139pb) i alel 13 (147pb) pokazali su podjednake signale tj. intenzitet, dok alel 12 (143pb) pokazao puno manji intenzitet.

Figure 4. Presentation of results of loci D18S858 analysis in person with mosaicism of trisomy of chromosome 18. Two alleles, allele 11 (139pb) and allele 13 (147pb) show identical signals i.e. intensity, while allele 12 (143pb) shows significantly lower intensity.

disomijom, te je i nakon umnažanja omjer DNA iznosio 1:23 u korist normalne DNA. Analizirajući uzorak na gelu nismo dobili klasični rezultat trisomije (3 različita alela - 1:1:1 ili 2 različita alela - 2:1) već rezultat kao na Slici 4. Vidljivo je da su dva alela (alel 11 i alel 13) imala podjednake signale tj. intenzitet, dok je alel 12 imao puno manji intenzitet. Ono što je presudno za dokazivanje mozaičnog oblika trisomije je broj stanica na što je ukazao i Pertl sa suradnicima, dokazavši mozaik trisomije 18 na uzorku s omjerom stanica 1:15 u korist diploidnih stanica (12). Međutim, broj slučajeva mozaicizma koji su do danas analizirani primjenom metode PCR-STR je u svakom slučaju nedostatan za izvođenje konačnog zaključka o potrebnom broju stanica i osjetljivosti same metode (13, 14).

Analizom STR-a u 105 uzoraka plodovih voda (Tablica 2.), niti jedan uzorak nije pokazao lažno negativan rezultat niti na jednom od testiranih lokusa. Prema nekim autorima, u pojedinim se uzorcima trisomija ne može odrediti zbog promjene u sekvenci koja nastaje unutar mjesta za vezivanje klice (15). Takva promjena može imati za posljedicu nepotpuno umnažanje ili izostanak umnažanja jednog alela (15). To je jedan od razloga zašto je za svaki kromosom potrebno analizirati najmanje dva lokusa. Drugi razlog za primjenu većeg broja lokusa STR za pojedini kromosom leži u činjenici da ponekad neki od lokusa nije informativan zbog homozigotnosti roditelja ili u slučajevima kad roditelji imaju iste alele (16, 17). Iz tih razloga smo za svaki kromosom umnažali po 3 lokusa STR. Također je nužno spomenuti da nismo imali nikakvih teškoća prilikom

umnažanja mikrosatelitskih lokusa, što ukazuje da je kvaliteta i količina izolirane DNK bila zadovoljavajuća, kao i uvjeti umnažanja.

I na kraju iz svega prije navedenog možemo reći da se analiza lokusa STR pokazala kao brza, jednostavna i pouzdana metoda koja nam omogućava brzo otkrivanje aneuploidija što je od osobite važnosti u prenatalnoj dijagnostici. Analiza je moguća i na uzorcima plodove vode s vidljivom kontaminacijom, također smo potvrdili da je metoda PCR-STR vrlo osjetljiva, te se mogu otkriti i slučajevi mozaicizma u uzorcima s izuzetno malom količinom trisomičnih stanica. Na temelju rezultata smatramo da je u analize aneuploidija neophodno uključiti barem tri lokusa STR za svaki pojedini kromosom.

#### LITERATURA

- Goldstein DB, Schlötterer C. *Microsatellites. Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York, 1999: 4.
- Koreth J, Leary OJ, McGee J. *Microsatellites and PCR genomics*. *Jour of Path* 1996; 178: 239-48.
- Mansfield ES. *Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms*. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 43-50.
- Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J. *Rapid detection of aneuploidies by microsatellites and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction*. *Prenat Diagn* 1997; 17: 1299-311.
- Chotai KA, Payne SJ. *A rapid PCR based test for differential molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes*. *J Med Genet* 1998; 35: 472-5.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. *A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. *Nuc Acids Res* 1998; 16: 1215-6.
- Grubić Z, Štingl K, Kaštelan A. *Determination of polymorphism at eight DTR loci in the Croatian population using automated detection*. *For Sci Internat* 2002; 127: 147-9.
- Petersen MB, Schizel AA, Binkert F. *Use of short sequence repeat DNA polymorphism after PCR amplification to detect the parenteral origin of the additional chromosome 21 in Down syndrome*. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 65-71.
- Pertl B, Weitgasser U, Kopp S, Kroisel PM, Sherlock J, Adinolfi M. *Rapid detection of trisomy 21 and 18 and sexing with quantitative fluorescent multiplex PCR*. *Hum Genet* 1996; 98: 55-9.
- Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, Tutschek B, Adinolfi M. *Assessment of quantitative fluorescent Multiplex PCR performed on single cells*. *Annals Hum Gen* 1998; 62: 9-23.
- Schmidt W, Jenderny J, Hecher K. *Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk*. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 855-60.
- Pertl B, Kopp S, Kroisel PM, Hausler M, Sherlock J, Winter R, Adinolfi M. *Quantitative fluorescent PCR for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex*. *Am J Obs Gyn* 1997; 177: 899-906.
- Levet LJ, Liddle S, Meredith R. *A large-scale evaluation of amnio-PCR for the rapid prenatal diagnosis of fetal trisomy*. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 17: 115-8.
- Rahil H, Solassol J, Philippe C, Lefort G, Jonveaux P. *Rapid detection of common autosomal aneuploidies by quantitative fluorescent PCR on uncultured amniocytes*. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 462-6.
- Pertl B, Yau Sc, Sherlock J, Davies AF, Mathew CG, Adinolfi M. *Rapid molecular method for prenatal detection of Down syndrome*. *Lancet* 1994; 343: 1197-8.
- Toth T, Findlay I, Papp C. *Prenatal detection of trisomy 21 and 18 from amniotic fluid by quantitative fluorescent polymerase chain reaction*. *J Med Genet* 1998; 35: 126-9.
- Verma L, Macdonald F, Leedham P, Dhanjal S, Hulten M. *Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome*. *Lancet* 1998; 352: 9-12.

#### Summary

#### APPLICATION OF THE SHORT TANDEM REPEAT LOCI IN PRENATAL DIAGNOSIS OF THE MOST FREQUENT ANEUPLOIDIES

K. Crkvenac Gornik, Z. Grubić, I. Tonković Đurišević, D. Mužinić, D. Begović, V. Kerhin Brkljačić

*The main problem of classic cytogenetics in the prenatal diagnosis is long duration of tests and very complex laboratory methodology. Application of PCR-STR method for analysis of satellite DNA in different fields of biology and medicine offers a possibility to apply this method in the prenatal diagnosis. Aims of the present study were: (I) to compare PCR-STR method with conventional cytogenetic method; (II) to introduce this method as routine method in prenatal screening (N=105) of uncultured amniotic fluid. Comparison between two methods did not revealed any false positive or false negative results (3 samples with trisomy of chromosome 18, 19 samples with trisomy of chromosome 21). In prenatal screening of 105 samples of uncultured amniotic fluid we found 6 (5.7%) samples with chromosomal abnormalities (1 sample with trisomy 18, 4 samples with trisomy 21,*

*and one sample with triploidy). The results were known after 4 days. In conclusion, this method is an accurate, reliable and very fast technique, which offers more information in prenatal diagnosis than classical cytogenetic methods.*

Descriptors: PCR-STR, ANEUPLOIDIES, PRENATAL DIAGNOSIS