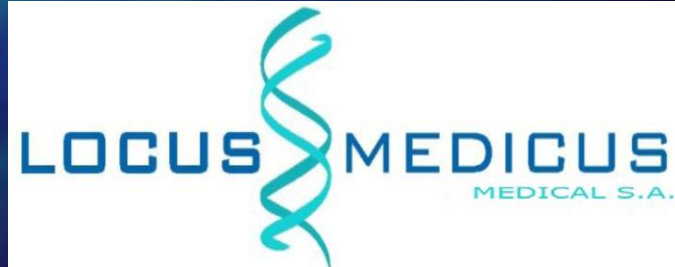


ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ
ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ
ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ

Βασιλική Μίχου, PhD

Υπεύθυνη Τμήματος Μοριακής Βιολογίας,
Locus Medicus



ΑΙΤΙΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΗΣ

- ΟΛΙΓΟΑΣΘΕΝΟΖΩΟΣΠΕΡΜΙΑ/ΑΖΩΟΣΠΕΡΜΙΑ
- ΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
- ΑΠΟΒΟΛΕΣ

ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

- ΚΑΡΥΟΤΥΠΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ
- FISH ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ
- ΜΙΚΡΟΕΛΜΕΙΨΕΙΣ ΤΟΥ Υ
- ΚΥΣΤΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

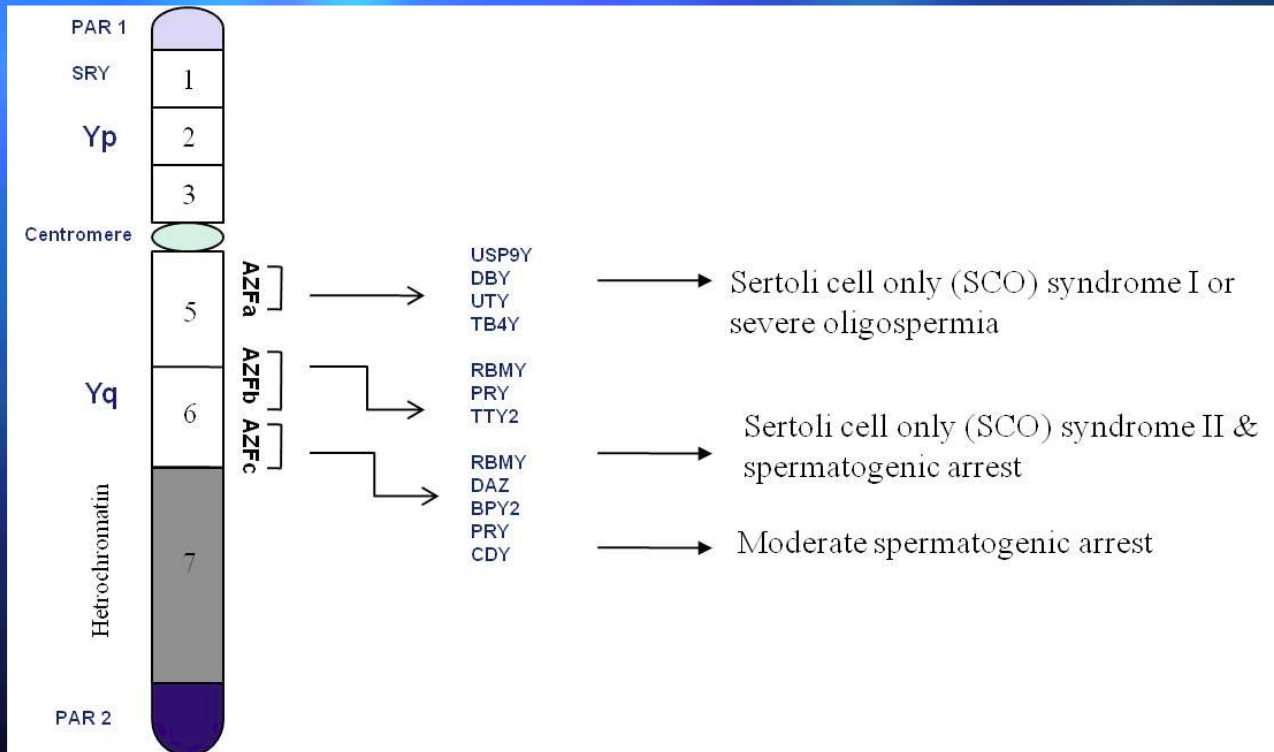
Y-microdeletions

ΕΑΑ/ΕΜΩΝ

- ΣΕ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΥΦΛΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ ΗΤΑΝ 2-10%
- ΟΡΙΣΤΟΥΝ ΟΔΗΓΙΕΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ (οι οποίες αναπροσαρμόζονται 1999, 2004, 2014)

■ ΓΕΝΙΚΟ ΠΛΥΘΗΣΜΟ 1:4000

■ 3.2% σε υπογόνιμους άνδρες έως 8% αζωοσπερμια.



Συχνότητα εμφάνισης ελλείψεων

- AZFc (80%)
- AZFa (0.5-4%)
- AZFb (1-5%)
- AZFbc (1-3%)
- AZFabc σχετίζονται και με παθολογικό καρυότυπο 46,XX male (SR Y positive) ή iso(Y) i(Y)(p10)

AZFc ΠΕΡΙΟΧΗ

- NAHR γεγονότα (αναδιατάξεις ομόλογων περιοχών) τα οποία οδηγούν σε μερική έλλειψη ή διπλασιασμούς που οδηγούν σε διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων (gene dosage variation).
- Μια έλλειψη με πιθανή κλινική σημασία είναι η **gr/gr**, παρόλο που η έλλειψη αφορά σχεδόν το μισό AZFc, η σημασία εξαρτάται από τον υπό μελέτη πληθυσμό.

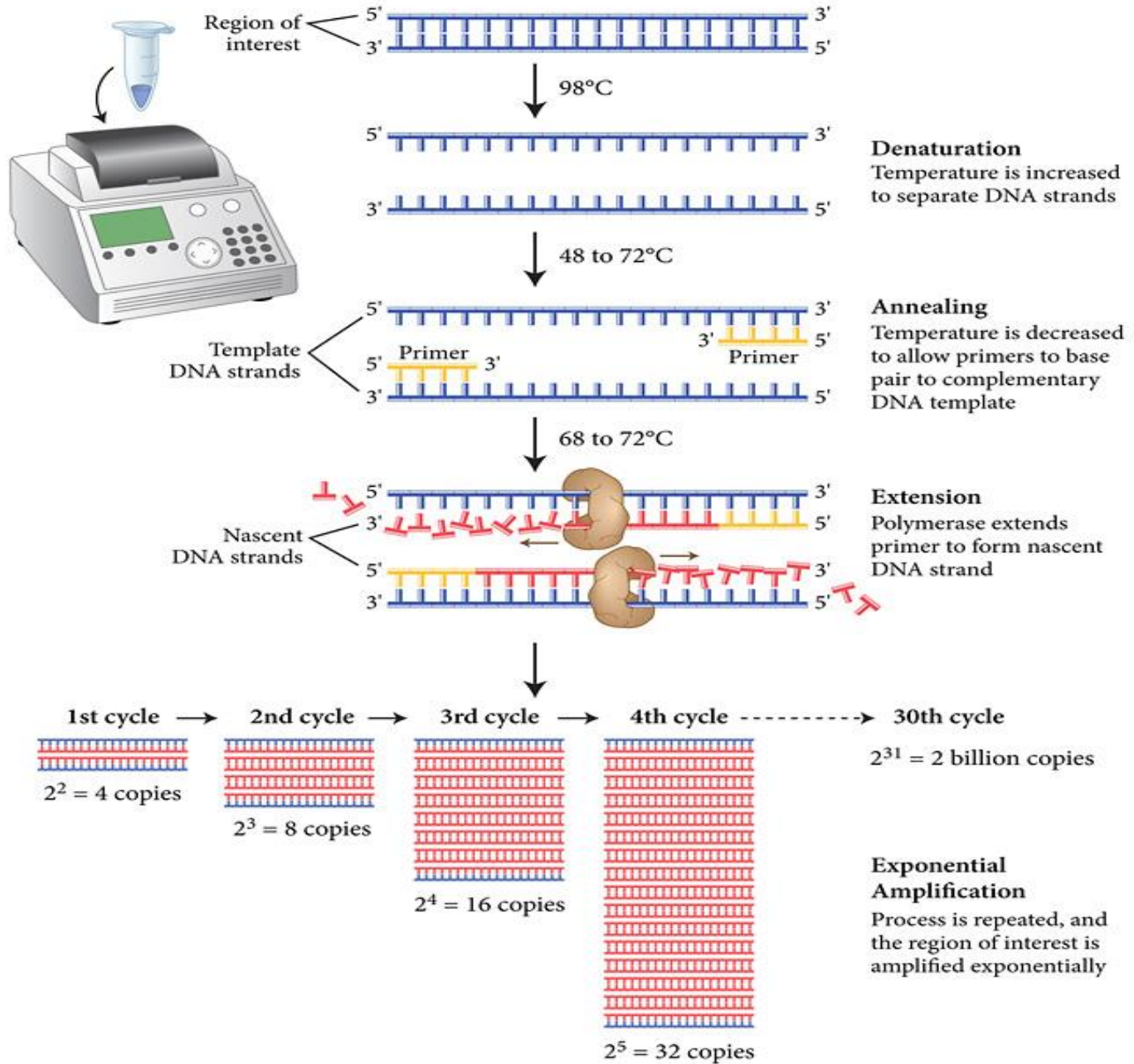
Gr/Gr

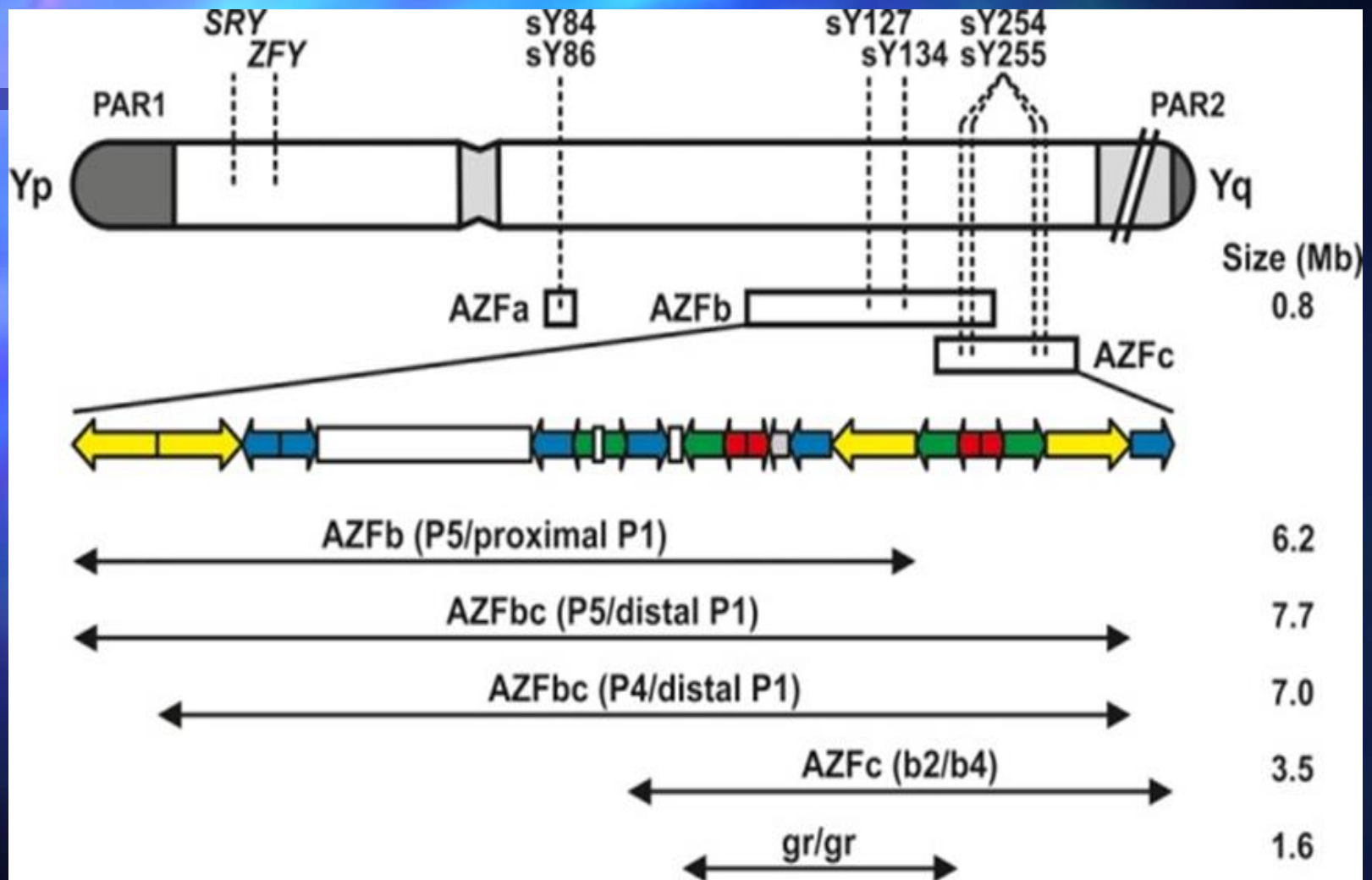
- Η έλλειψη σε συγκεκριμένες περιοχές όπως Κίνα και Ιαπωνία οι απλότυποι δεν σχετίζεται με την υπογονιμότητα
- Ενώ φαίνεται ότι λειτουργεί επιβαρυντικά με την ηλικία
- Καθώς και επιτρέπει την μεταφορά από γενιά σε γενιά.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΛΛΕΙΨΕΩΝ

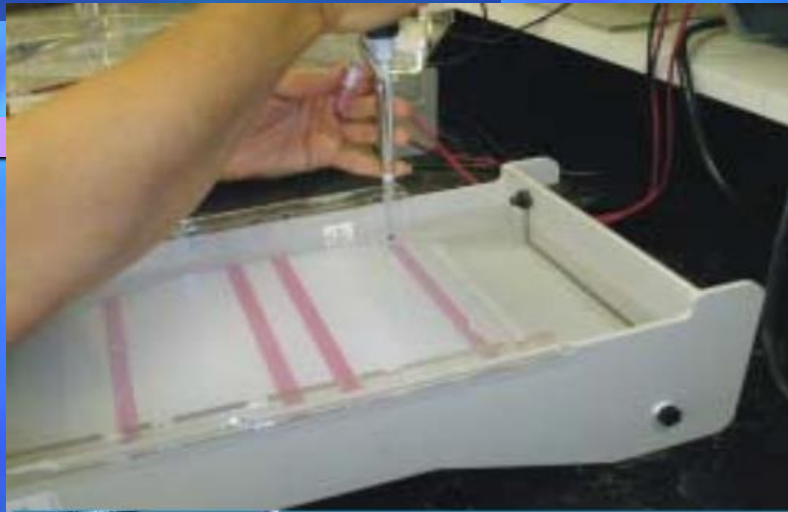
- Λήψη περιφερικού αίματος
- Απομόνωση γενετικού υλικού
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- Οπτικοποίηση

PCR



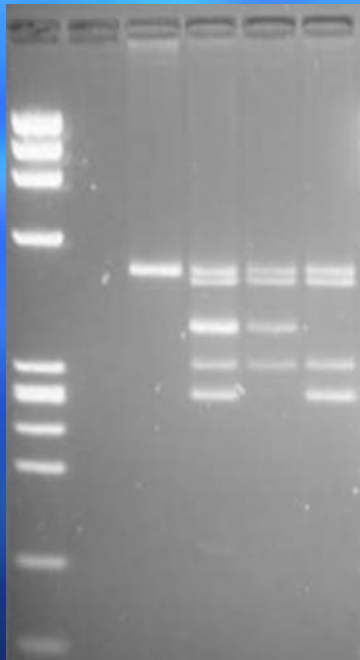


Οπτικοποίηση



Σύμφωνα με τις οδηγίες του European Molecular Genetics Quality Network:

- Διπλός έλεγχος με θετικό και αρνητικό μάρτυρα και SRY και ZFX/Y περιοχές.



Multiplex A:

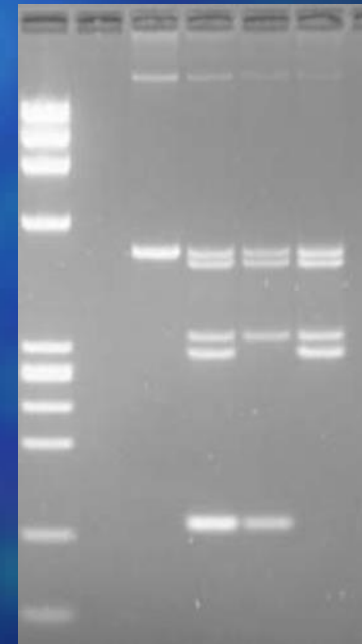
ZFY : 495 bp

SRY : 472 bp

sY254 : 400 bp (AZFc)

sY86 : 320 bp (AZFa)

sY127 : 274 bp (AZFb)



Multiplex B:

ZFY : 495 bp

SRY : 472 bp

sY84 : 326 bp (AZFa)

sY134 : 301 bp (AZFb)

sY255 : 126 bp (AZFc)

Σύμφωνα με τις οδηγίες του European Molecular Genetics Quality Network:

- Διπλός έλεγχος με θετικό και αρνητικό μάρτυρα και SRY και ZFX/Y περιοχές.



Multiplex A:

ZFY : 495 bp

SRY : 472 bp

sY254 : 400 bp (AZFc)

sY86 : 320 bp (AZFa)

sY127 : 274 bp (AZFb)



Multiplex B:

ZFY : 495 bp

SRY : 472 bp

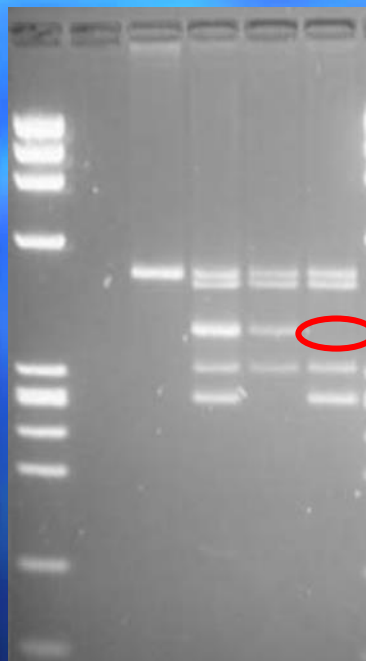
sY84 : 326 bp (AZFa)

sY134 : 301 bp (AZFb)

sY255 : 126 bp (AZFc)

Σύμφωνα με τις οδηγίες του European Molecular Genetics Quality Network:

- Διπλός έλεγχος με θετικό και αρνητικό μάρτυρα και SRY και ZFX/Y περιοχές.



Multiplex A:

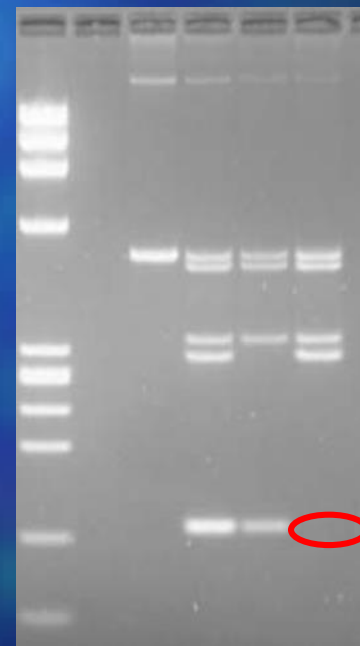
ZFY : 495 bp

SRY : 472 bp

sY254 : 400 bp (AZFc)

sY86 : 320 bp (AZFa)

sY127 : 274 bp (AZFb)



Multiplex B:

ZFY : 495 bp

SRY : 472 bp

sY84 : 326 bp (AZFa)

sY134 : 301 bp (AZFb)

sY255 : 126 bp (AZFc)

ΕΚΘΕΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Ανίχνευση μικροελλείψεων στην περιοχή του “αζωοσπερμικού παράγοντα” (AZF) του χρωμοσώματος Y με τη μέθοδο της πολλαπλής (multiplex) αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Όνοματεπώνυμο ασθενούς: *****

Ηλικία: Κωδικός δείγματος:

Είδος εξεταζόμενου υλικού: Π.Αίμα

Ημερομηνία παραλαβής:

Ένδειξη:

Μεθοδολογία

Από 0.2ml περιφερικού αίματος απομονώθηκε ολικό DNA, μέρος του οποίου υποβλήθηκε σε δύο παράλληλες multiplex PCR με ζεύγη εκκινητών, τα οποία πολλαπλασιάζουν τμήματα 400, 320 και 274 νουκλεοτιδίων των γονιδίων AZF_a, AZF_b και AZF_c, αντίστοιχα (multiplex A), και τμήματα 326, 301 και 126 νουκλεοτιδίων των γονιδίων AZF_a, AZF_b και AZF_c, αντίστοιχα (multiplex B) του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος Y (Yq11.21-23). Στις ίδιες αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενισχύουν τμήμα μεγέθους 472 βάσεων του ολανδρικού γονιδίου SRY (Yp11.3) και αλληλουχία 495 νουκλεοτιδίων του γονιδίου ZFY/ZFX των ψευδοαυτοσωμικών (ομόλογων) περιοχών των χρωμοσωμάτων Y και X (Yp11.3-Xp21.3, εσωτερικός μάρτυρας αντιδράσεων). Το σύνολο των εκκινητών επιλέχθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του *Ευρωπαϊκού Δικτύου Ποιότητας στη Μοριακή Γενετική* (EMQN). Αξίζει να αναφερθεί ότι, με βάση τα παγκόσμια βιβλιογραφικά δεδομένα, σε άντρες οι οποίοι απέκτησαν παιδιά χωρίς αναπαραγωγική υποβοήθηση, δεν έχει παρατηρηθεί ποτέ έλλειψη των ανωτέρω ενισχυόμενων αλληλουχιών. Εκτός του υπό εξέταση δείγματος, στην ίδια μοριακή δοκιμασία υποβλήθηκε DNA περιφερικού αίματος αποδεδειγμένα γόνιμου άνδρα (γονέα) (θετικός μάρτυρας τεχνικής), DNA περιφερικού αίματος γυναίκας (αρνητικός μάρτυρας). Τα προϊόντα των αντιδράσεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 3,5% και οπτικοποιήθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Αποτέλεσμα

Multiplex A

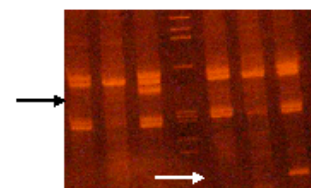
1. DNA υπό εξέταση δείγματος
2. DNA περ. αίματος γόνιμου άνδρα
3. DNA περ. αίματος γυναίκας
4. Δείκτες μεγέθους DNA (Φκ/174 HaeIII)

Multiplex B

5. DNA υπό εξέταση δείγματος
6. DNA περ. αίματος γόνιμου άνδρα
7. DNA περ. αίματος γυναίκας

Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

1 2 3 4 5 6 7

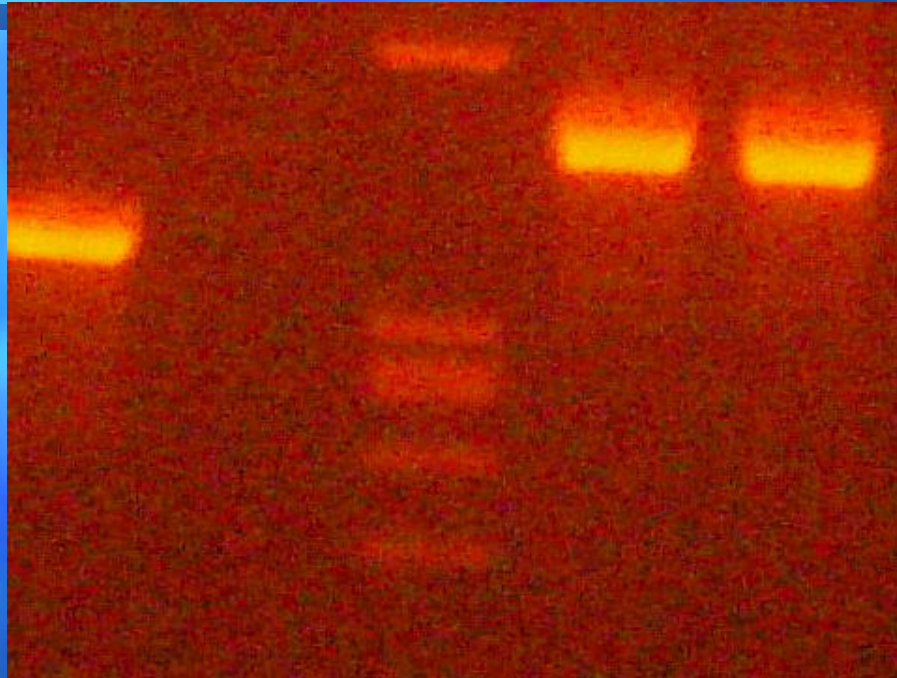


Συμπέρασμα

- Στο εξετασθέν υλικό ανιχνεύθηκε μικροελλείψη στην περιοχή του “αζωοσπερμικού παράγοντα” AZF_c του χρωμοσώματος Y με τη μέθοδο της multiplex PCR.
- Το παραπάνω εύρημα πρέπει να συζητηθεί με τον προσωπικό του ιατρού και να συμβουλευτεί κλινικό γενετιστή και να συσχετιστεί με τα υπόλοιπα κλινικοεργαστηριακά δεδομένα του ασθενούς.

Η ευαισθησία και η ειδικότητα της τεχνικής προσεγγίζουν το 100%.

Βασιλική Μ. Ψηφί
Παθολογική Βιολογία Ρ.Π.Δ



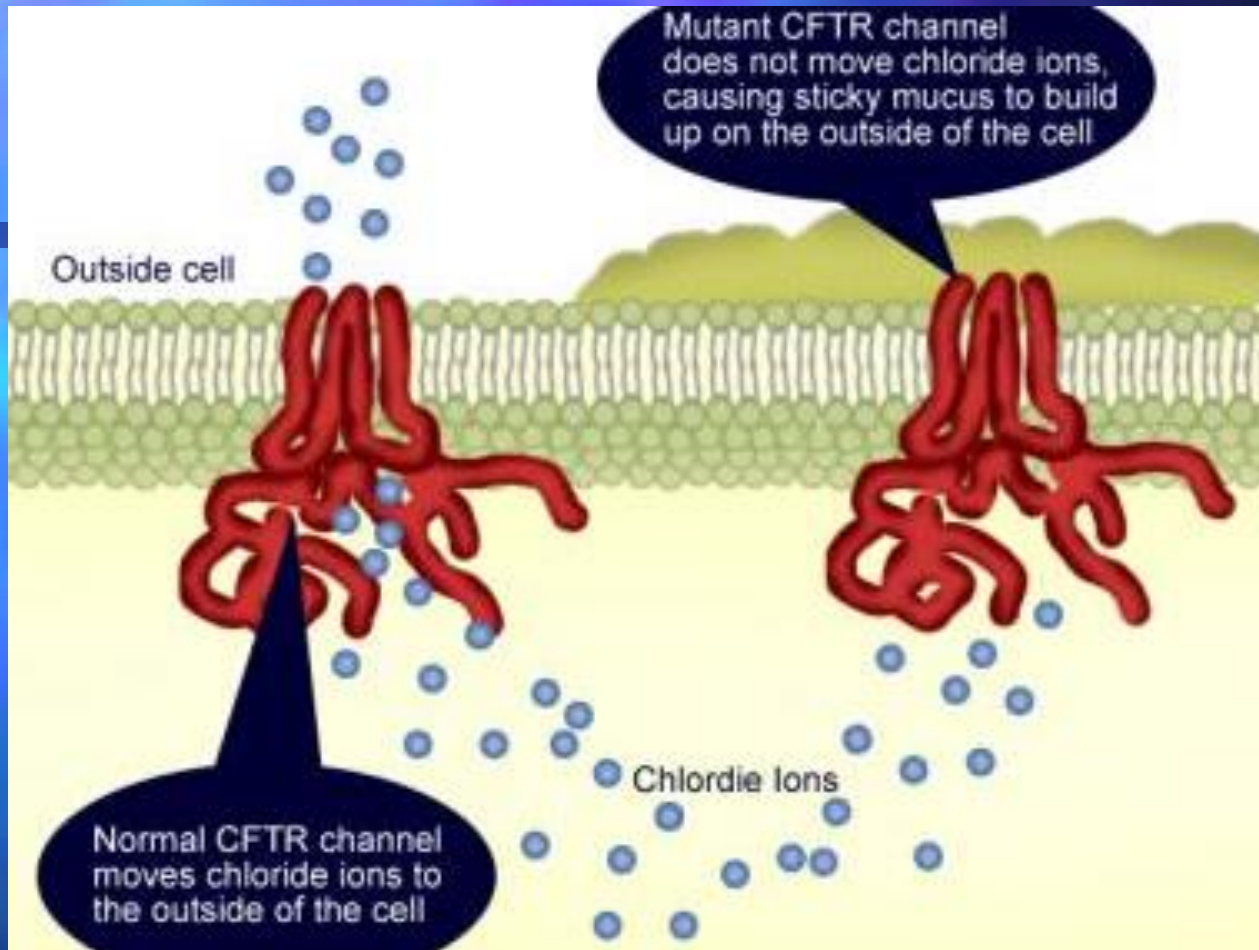
**ΈΛΛΕΙΨΗ gr/gr-απουσία της περιοχής
SY1291**

Διάγνωση των ελλείψεων -προγνωστική αξία

- TESE/micro-TESE , δεν προτείνεται σε AZFa ενώ έχει ελάχιστες πιθανότητες σε AZFb έλλειψη
- AZFc 50% πιθανότητα micro-TESE και σύλληψης με ICSI.
- Χαμηλή ποιότητα εμβρύων και χαμηλά ποσοστά επιτυχημένης εγκυμοσύνης.
- Προτείνουμε γενετική συμβουλευτική και έλεγχο και άλλων ατόμων σε αναπαραγωγική ηλικία.
- Η έλλειψη gr/gr έχει συσχετιστεί με αυξημένη προδιάθεση καρκίνου των όρχεων.

CFTR

- Ρυθμιστική πρωτεΐνη η οποία εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα πολλών οργάνων όπως πνεύμονες, ήπαρ, πάγκρεας, πεπτικό, ουροποιητικού και δέρματος.



Απουσία, υπολειτουργία ή χαμηλή συγκέντρωση της πρωτεΐνης CFTR παράγεται παχύρρευστη κολλώδη βλέννη η οποία αποφράσει τους πόρους των αδένων σταδιακά καταστρέφοντας τους.

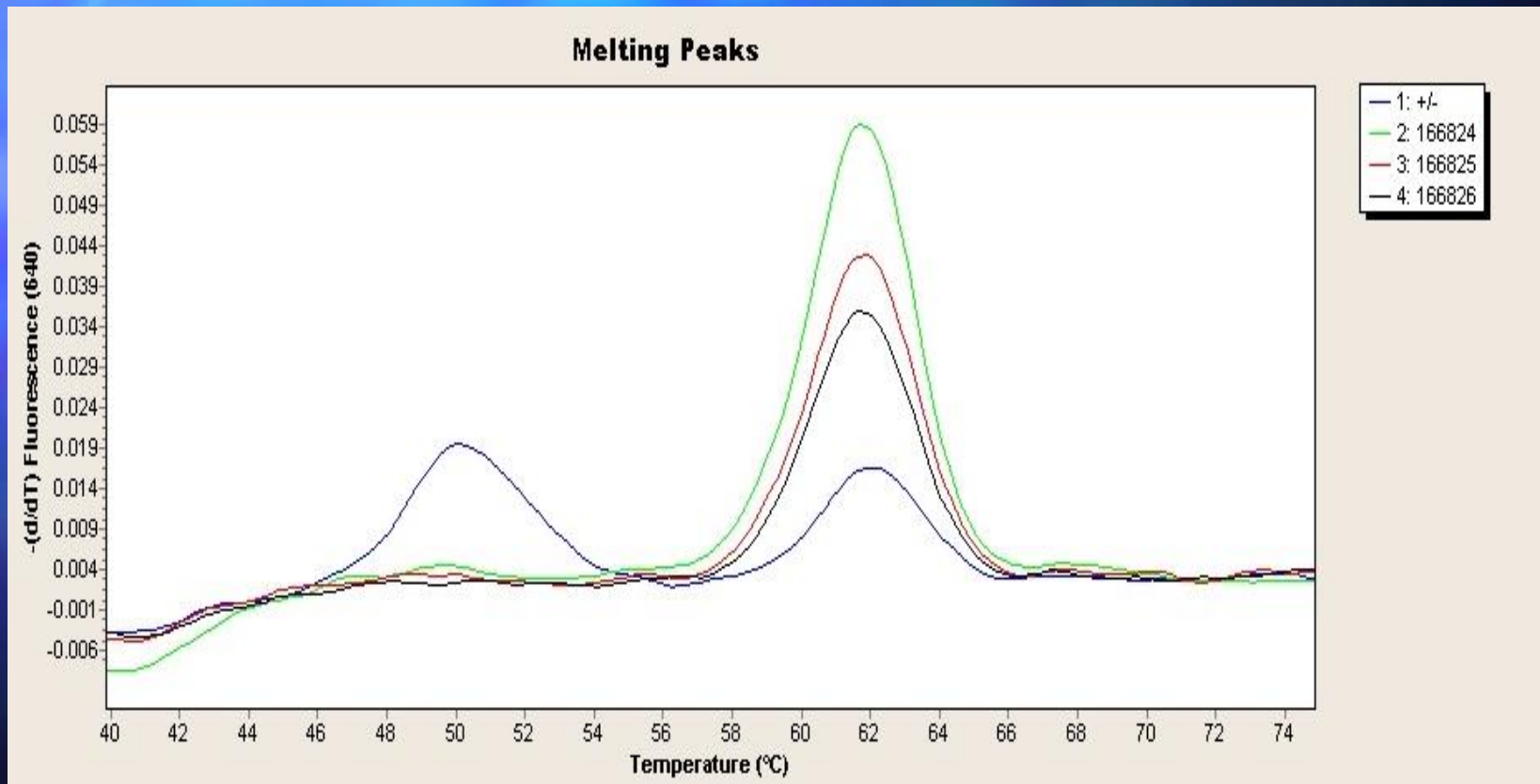
2000 μεταλλάξεις κυστικής ίνωσης

- CBAVD (95% CF MUTATIONS)
- 2% ταυτόχρονη παρουσία CF causing mutation/ με πολυμορφισμό 5T ή 7T poly T (εσώνιο 8) ή R117H

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

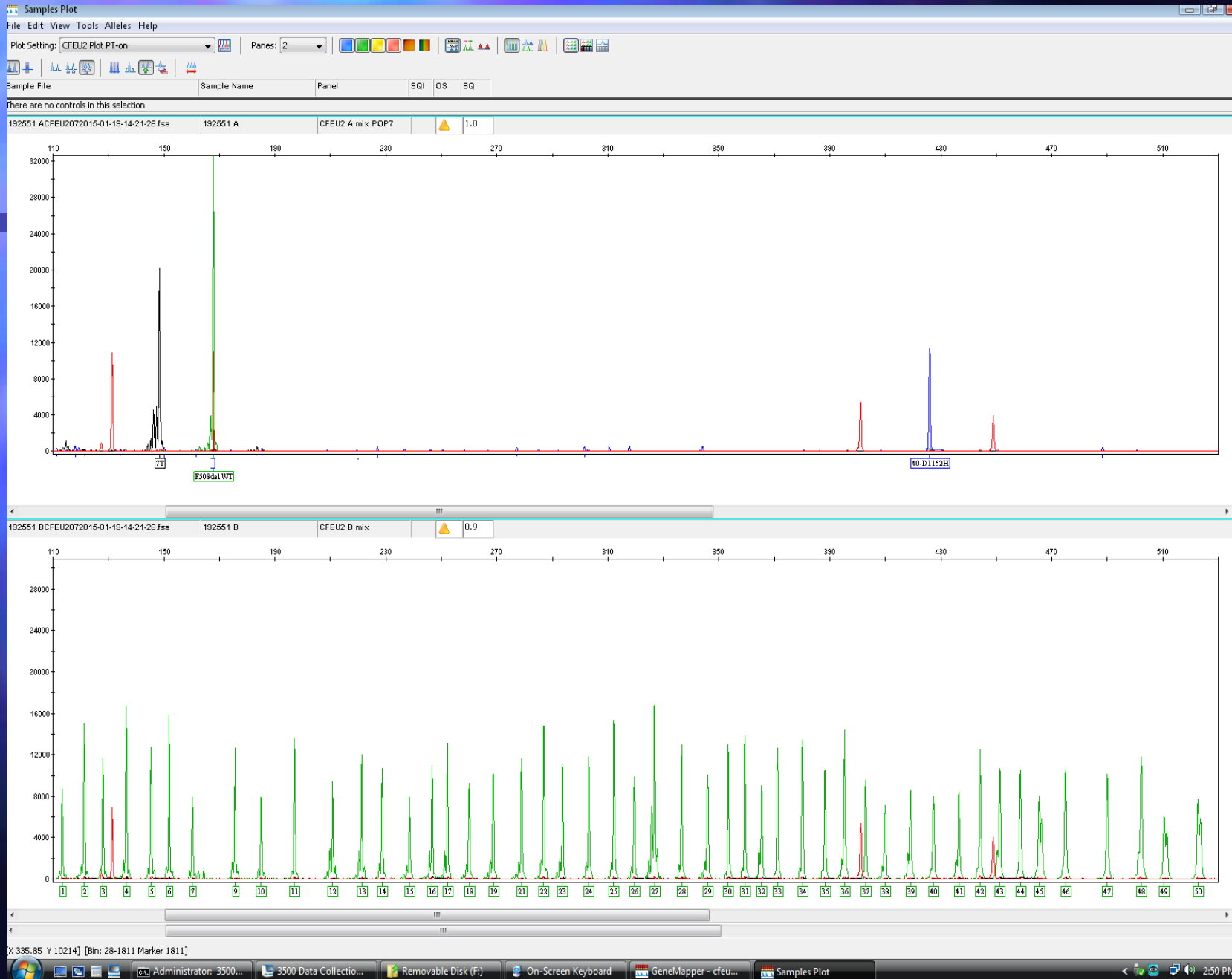
- Λήψη περιφερικού αίματος
- Απομόνωση γενετικού υλικού
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- Οπτικοποίηση

Ανίχνευση μετάλλαξης F508del



Γενετικός αναλυτής





Samples Plot

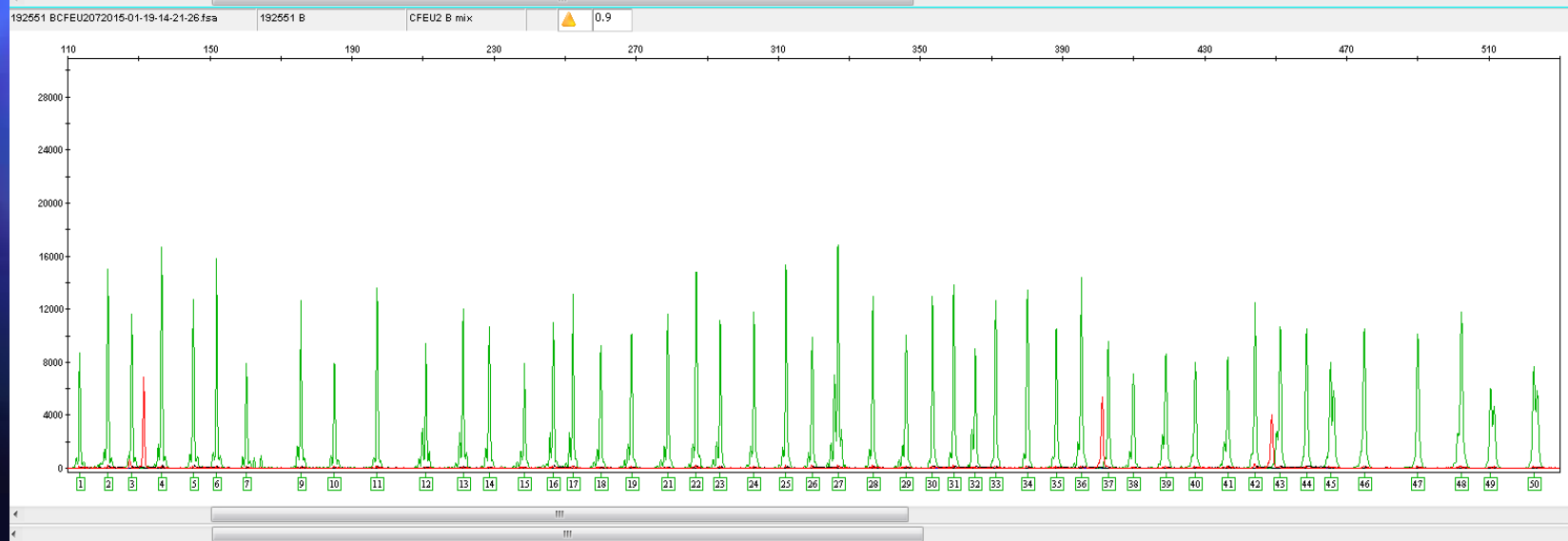
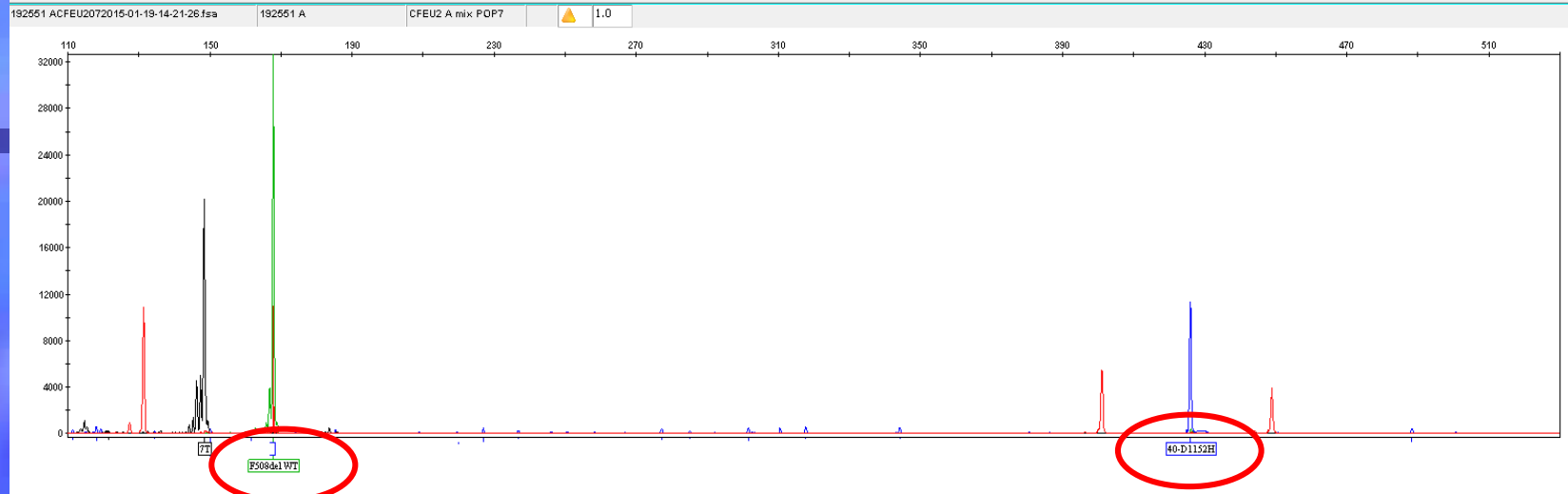
File Edit View Tools Alleles Help

Plot Setting: CFEU2 Plot PT-on Panes: 2



Sample File Sample Name Panel SQI OS SQ

There are no controls in this selection



X 335.85 Y 10214 [Bin: 26-1811 Marker 1811]



Κλινικές Γενετικές
Αρ. Πρωτ. 621



Αθήνα, 14/11/2014

ΕΚΘΕΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Ανίχνευση Μεταλλάξεων CFTR σε γενετικό αναλυτή CE, IVD

Επίθετο: *****
Παραπέμπων:
Αρ. Παραπεμπτικού: 188733

Όνομα: *****
Είδος Εξεταζόμενου Υλικού: Π. Αίμα
Ημερ.Εισαγωγής: 13-11-2014

Αποτέλεσμα

Ετεροζυγότης F508del; IVS8 variant: 5T/5T

Συμπέρασμα

Το δείγμα προέρχεται από φορέα μετάλλαξης στο γονίδιο της κυστικής ίνωσης. Η μέθοδος καλύπτει ~78% των γνωστών μεταλλάξεων του ελληνικού πληθυσμού.

Σχόλια

- Η κυστική ίνωση είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη νόσος. Συνίσταται ο έλεγχος και των δύο γονέων του εξεταζόμενου για να επιβεβαιωθεί η προέλευση της μετάλλαξης, καθώς και περαιτέρω έλεγχος του δείγματος ώστε να αποκλειστεί η παρουσία άλλων μεταλλάξεων.
- Συνιστάται ο έλεγχος του άμεσου οικογενειακού του περιβάλλοντος και ειδικότερα των ατόμων που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία.
- Σε κάθε περίπτωση πρέπει να συζητήσει το παραπάνω εύρημα με τον προσωπικό του ιατρό και να συμβουλευτεί κλινικό γενετιστή.

Βασιλέα Μίση
Μαργαρίτα Ξιολόγος PhD

¹Technical standards and guidelines for CFTR mutation testing. ACCM 2006 edition
²The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. WHO 2002
³Stobidillo et al Human Mutation 2002;19:375-606

Μέθοδος: Από 200 μl αίματος απομονώθηκε ολικό DNA, η ποσότητα και η ποιότητα του οποίου ελέγχθηκε φασματοφωμετρικά. Στην κυρίως αντίδραση PCR, χρησιμοποιήθηκαν σημειωμένα εσόντια (Eusoflans CF-802, CE, In Vitro Διαγνωστικά) που πολλαπλασιάζουν επιλεκτικά τμήματα των γονιδίων της κυστικής ίνωσης, στη συνέχεια ακολουθήσε ανάλυση με τροχιά (Capillary) ηλεκτροφόρηση σε γενετικό αναλυτή (ABI 3500, Genetic Analyser), και ανάλυση δεδομένων με το πρόγραμμα GeneMapper. Οι μεταλλάξεις που ελέγχθηκαν καλύπτουν το ~78% των γνωστών μεταλλάξεων¹ (μετά τις παρατηρούμενες) στον ελληνικό πληθυσμό (CFTRdel 2,3, 650X, P67L, G85E, 394delTT, 444delA, R117C, R117H, Y122X, 621+1G>T, 711+1G>T, L206W, 1078delT, R334W, R347P, R347H, A455E, 1507del, F508del, 1677delTA, V520F, 1717-1G>A, G542X, S549R(T>G), S549N, G551D, R553K, R560T, 1811+1.68A>G, 1898+1G>A, 2143delT, 2184delA, 2347delG, W842X, 2789+5G>A, Q890X, 3120+1G>A, 3272-26A>G, R106C, Y1092X(C>A), M1103K, D1152H, R1158K, R1162Q, 3659delC, 3849+10kbc>T, S1251N, 3905insT, W1282X, N1303K καθώς και το αλληλόμορφο Inr VIII (9T), Inr VIII (7T), Inr VIII (5T).

NGS

MiSeqDx Cystic Fibrosis Workflow

Standardized workflow for both assays



NGS

- Ταυτόχρονη αλληλούχιση πολλών μικρών κομματιών DNA (μέχρι 100-150bp)
- 139 μεταλλάξεις κυστικής ταυτόχρονα σε 8 δείγματα
- Πλήρης αλληλούχιση του γονιδίου ταυτόχρονα σε 8 δείγματα.

**Thank you for you
FOR YOUR ATTENTION**



**ANY DOUBT
CONSULT GOOGLE**

creator.org