

Iulia Grosu, V.Scurtu, R.Strătilă, Victoria Sacară.

DIAGNOSTICUL PRENATAL AL DISTROFIEI MUSCULARE DUCHENNE ȘI ATROFIEI MUSCULARE SPINALE PE PARCURSUL A 4 ANI ȘI EFICACITATEA METODOLOGIILOR DE DIAGNOSTIC EXISTENTE ÎN REPUBLICA MOLDOVA

IMSP Institutul Mamei și Copilului (director general- dr. med. conf. univ. Ștefan Gațcan)
Centrul de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală (director - dr. med. M.Strătilă)

SUMMARY

PRENATAL DIAGNOSIS OF MUSCULAR DYSTROPHY AND SPINAL MUSCULAR ATROPHY FOR LAST 4 YEARS AND EFFICIENCY OF PRESENT METHODOLOGY OF PRENATAL DIAGNOSIS IN R. OF MOLDOVA

Key words: prenatal diagnosis, PCR/RFLP, MPCR, markers, linkage, muscular dystrophy Duchenne/Becker, spinal muscular atrophy SMA, carrier, pregnancy, strategies, methods.

Introduction. Severity of hereditary diseases is already well known throughout the world. The monitoring and prevention of hereditary diseases are the current tasks of medical genetics and health. Prenatal diagnosis (PD) is one of the methods proposed to prevent the birth of children with congenital malformations incorrigible, monogenic and chromosomal pathologies. Muscular dystrophy Duchenne / Becker and spinal muscular atrophy are neuromuscular hereditary X-linked and respectively autosomal recessive disorders and that are frequently encountered in Moldova and can be detected through prenatal diagnosis.

Materials and methods. The research was held in the scientific department of the Centre for Reproductive Health and Medical Genetics, Laboratory of Human Molecular Genetics. After medico-genetic consultation pregnant women who are at risk of having a pregnancy affected by a hereditary disease, namely Duchenne and Becker muscular dystrophy (DMD/B) and spinal muscular atrophy (SMA) undergo prenatal diagnosis (PD), which Moldova is achieved by methods such as multiplex PCR, PCR / RFLP, the primer sets specific and polymorphic sites.

Purpose. Purpose of the work is to present data of prenatal diagnosis of neuromuscular disorders with high frequency in Moldova during the last four years.

Results. In total were performed 14 prenatal diagnoses: 9 - DMD/B and 5 for SMA during 2011-2014. Making the prenatal diagnosis of DMD/B and SMA has allowed the direct analysis of deletions or RFLP test and were detected 4 affected fetuses, 3 of them were with DMD / B and 1 with SMA. Have been analyzed the strategies for prenatal diagnosis of these diseases in different countries and methods of them.

Conclusions. Prenatal diagnosis is an important strategy and an effective way to prevent the birth of children with hereditary monogene diseases in families at risk. This strategy applies to all populations, but with different methodologies. The methods of modern molecular genetic prenatal diagnosis raise the efficiency and precision to 98%. Efficiency of prenatal diagnosis in Moldova is 71,4%. Analyzing different diagnostic methods used in the world was proposed the method which will be better implemented in Moldova.

РЕЗЮМЕ

ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ И СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ ЗА ПОСЛЕДНИЕ 4 ГОДА И ЭФФЕКТИВНОСТИ СУЩЕСТВУЮЩЕЙ МЕТОДОЛОГИИ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ В РЕСПУБЛИКЕ МОЛДОВА

Ключевые слова: пренатальная диагностика, ПЦР/ПДРФ, МПЦР, маркеры, сцепление, Миодистрофия Дюшенна/Беккера (МДД/Б), спинальная мышечная атрофия (СМА), носительство, беременность, стратегии, методы.

Введение. Тяжесть наследственных заболеваний хорошо известна во всем мире. Лечебно-диагностические стратегии и методы анализируются и затем ставятся акценты в их развитии. Ключевой особенностью является неравномерного их распределение. Мониторинг и предотвращение наследственных заболеваний являются текущими задачами медицинской генетики. Пренатальная диагностика (ПД) является главным методом предотвращения рождения детей с моногенной и хромосомной патологии. Миодистрофия Дюшенна / Беккера и спинальная мышечная атрофия являются наследственными нервно-мышечными болезнями, которые часто встречаются в Р. Молдова и проведение ПД этих заболеваний возможно в нашей стране.

Материалы и методы. Исследования проводились в научном отделе Центра Репродуктивного Здоровья и Медицинской Генетики, в лаборатории молекулярной генетики человека. После медико-генетического консультирования беременных женщин с высоким риском наследственных болезней, а именно МДД/Б и СМА проводится ПД. Мультиплексная ПЦР и анализ сцепления (ПЦР- ПДРФ) используются в Республике Молдова.

Цель. Анализ результатов пренатальной диагностики, проведенных за последние четыре года в Лаборатории молекулярной генетики человека и оценка эффективности ПД в РМ.

Результаты. В течение 2011-2014г. было сделано 14 пренатальных диагностических тестов: 9ПД на МДД/Б и 5 на СМА. Используя прямой поиск протяженных делеций методом МПЦР и анализ сцепления (ПЦР- ПДРФ) позволило выявить 4 плода с наследственными болезнями: 3 плода с МДД/Б и одного с СМА. Проанализировано стратегии и методы ПД, использующиеся в разных странах в настоящее время и проведен анализ эффективности применения существующих методов ПД в РМ. Эффективность составляет 71,4%.

Выводы. Пренатальная диагностика является важной стратегией и эффективным способом предотвратить рождение детей с наследственными моногенными заболеваниями. Стратегия ПД применяется во многих популяциях, но с использованием различных методов. Применение молекулярно-генетических методов при современной ПД повышает эффективность и точность до 98% по данным литературы, но эффективность ПД в РМ составляет 71,4%. Предложены современные молекулярно-генетические методы ПД, которые повысят эффективность и точность ПД.

Introducere. Distrofia musculară Duchenne/Becker (DMD/B)) și atrofia musculară spinală (SMA) sunt boli severe neuromusculare, monogenice, care au o incidență crescută în populația R.Moldova[9] și în lume[7]. DMD/B boală cu transmitere X-linkată recisiv, de obicei este clinic diagnosticată până la vârsta de 5-6 ani, vârsta medie de supraviețuire este de 25 ani. Incidența DMD este de aproximativ 1 la 3500 de băieți născuți (Tabel nr.1), iar distrofia musculară Becker (BMD), o variantă mai ușoară de DMD, are o incidență de 1 la 18 450 bărbați. În Moldova distrofia musculară progresivă s-a înregistrat la 412 pacienți, cu frecvența de 11,5 cazuri la 100 000 locuitori. Bolile ereditare din acest grup reprezintă 46% și includ pseudohipertrofia X-linkată, centura membrilor autozomale. În subgrupul de miodistrofie X-linkată, pseudohipertrofia se întâlnește cel mai des la copii, și mai apoi progresează la forma Duchenne/Becker(204 familii- 234 bolnavi) cu frecvența 6,11 la 100 000 locuitori. [9] Mutații de novo reprezintă o treime din pacienții DMD [13, Chamberlain].

Atrofia musculară spinală (SMA) este o maladie transmisă autozomal recisiv ce provoacă decesul unui copil cu o incidență raportată de circa 1 la 10 000 de nou-născuți vii [12]. Aproximativ 10-16 din fiecare 100,000 copii se nasc cu SMA.[6] Amiotrofia spinală s-a înregistrat la 137 de pacienți din 106 familii. Răspîndirea în populația Moldovei constituie 3,8 cazuri la 100 000 oameni. Frecvența bolilor ereditare neuromusculare este de 15%. În 97,1% din observații, putem presupune modul autozomal-recesiv de moștenire, iar în 2,9% modelul autozomal-dominant (s-a confirmat la nivel molecular) [9].

În cazul acestor boli importanța prevenirii apariției lor este mult accentuată, deoarece nici un tratament curativ nu este disponibil momentan. Femeilor ce prezintă risc li se poate oferi consultație genetică și teste în baza cărora se poate determina dacă ele sunt purtătoare de mutație sau nu. Opțiuni pentru femeile purtătoare sunt diagnosticul prenatal, diagnosticul genetic în cazul preimplantării sau folosirea unui ovul de donator. În articolul de față vom vorbi în special despre diagnosticul prenatal al acestor 2 maladii, despre etapele realizării, eficiența și necesitatea schimbării atitudinii populației și a medicilor în scopul realizării acestui pas.

Diagnosticul prenatal (DPN) este un act medical

complex, înalt informativ, care permite depistarea a numeroase anomalii congenitale și boli genetice în cursul vieții fetale. Acest serviciu este realizat corect numai printr-o strânsă colaborare multidisciplinară, în care medicul genetician are un rol esențial în evaluare, diagnostic și sfat genetic [5].

Anual în lume se nasc peste 2 milioane de copii cu maladii ereditare. Mai mult de jumătate din ei vor muri în primii ani de viață sau vor deveni invalizi. Ceilalți vor necesita îngrijire medicală și socială permanentă [9].

Tabelul 1

Datele epidemiologice din diferite părți ale lumii pentru DMD [7].

Populația	Date
Canadiană	1 : 4700 băieți născuți în perioada 1969 - 2008 ²
Americană	Rata prevalenței nașterii: 1 în 3,500 (2.9 la 10,000) băieți născuți ³
Europeană	11.99x10 ⁻⁵ băieți născuți vii din 1977 până în 1990 ⁴
Japoneză	Rata de incidență: 29.2x10 ⁻⁵ , rata de prevalență: 6.72x10 ⁻⁵ ⁵

Obiectivele principale ale diagnosticului prenatal sunt:

- Prezentarea viitorilor părinți a unei informații detaliate în privința riscului de a se naște un copil bolnav
- În cazul unui risc crescut- informarea părinților despre posibila neceitate de a întrerupe sarcina și urmările deciziei luate-întreruperea sarcinii sau nașterea unui copil bolnav
- Asigurarea diagnosticului timpuriu al unei patologii intrauterine și a unei tactici optime de gestionare a sarcinii
- Determinarea prognozei sănătății viitorilor copii [10].

Identificarea unui cuplu „la risc“ de a avea un copil afectat de o boală genetică sau de o anomalie cromozomială necesită luarea în discuție a următoarelor situații (Galjaard H, 1980; Milunsky A, 1979):

• **Situații cu risc scăzut (mai mic sau egal cu 1/100)**

- Femeie cu vârsta de 38 de ani sau mai mică
- Cupluri care au avut anterior un copil cu trisomie primară (trisomie 13, trisomie 18, trisomie 21)
- Cupluri cu grad primar de rudenie ce au avut un defect al tubului neural.

• **Situații cu risc moderat (1/20-1/100)**

- Mame cu vârsta de 39 de ani sau mai mare
- Toți care sunt „purtători“ ai unei translocații (ex: D/G

sau G/G)

- Copil anterior cu un defect de închidere a SNC
- Cazuri în care fiecare părinte este purtător al unei boli autozomal-recesive

• **Situații cu risc crescut (1/20 sau peste)**

- Ambii părinți sunt „purtători” ai unor boli autozomal-recesive
- Unul din părinți este purtător de o boală autozomal dominantă
- Părinții au avut 2 copii cu defect de închidere a SNC
- Mama este „purtătoare” a unei boli recesive X-linkate(DMD; SMA)
- Fiecare părinte este un ”purtător” balansat deleție-inserție [11].

Scopul prezentei lucrări date este de a analiza rezultatele diagnosticului prenatal obținute în Laboratorul de Genetică Moleculară Umană din cadrul Centrului de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală în diagnosticul patologiilor neuromusculare cu frecvență sporită în Republica Moldova, pe parcursul a ultimilor 4 ani.

Materiale și metode. În materialul prezentat noi vom releva anume analizele molecular-genetice ce se întreprind în cazul riscului de a se naște un copil afectat de distrofia musculară Dushenne sau amiotrofia musculara spinală. În urma consultului medicului genetician și deciziei de a realiza procedura de diagnostic prenatal urmează parcurgerea anumitor etape și întocmirea metodelor de diagnostic.

Grupul de studiu. Studiul a fost efectuat în cadrul departamentului științific al IMSP Institutul Mamei și Copilului, în Laboratorul de Genetică Moleculară Umană. Persoanele care au fost supuse diagnosticului prenatal molecular-genetic sunt femei în familia cărora s-a născut un copil bolnav de miotrofia Dushenne (nepoți, frați) sau cele care au născut un copil bolnav (SMA și DMD) și prezintă risc crescut de a naște copii cu aceste maladii.

Amniocenteza (AC) o puncție amniotică ce poate fi făcută începând cu săptămâna 16 -17 de sarcină (trimestrul al II-lea). După datele aflate la dispoziție până în prezent, riscul de avort după o amniocenteză făcută înainte de săptămâna a 16-a este prea mare. După prelevarea probei, recipientele care o conțin se închid ermetic, se marchează și se trimit la laborator pentru testare și se face din nou ecografie. Complexitatea și numărul analizelor la care sunt supuse celulele și lichidul amniotic sunt impuse de riscul fiecărei sarcini în parte [5].

ADN-ul genomic se extrage după kit-uri specializate (QiAamp DNA Mini kit, Germania) din amniocitele recoltate prin metoda invazivă-amniocenteza și din sângele periferic de la membrii familiilor [14].

Analiza genetică. Din cauza materialului genetic redus ce se poate obține din lichidul amniotic se folosesc metode mai sensibile, ca reacția lanțului de polimerază (PCR), care este o metodă in vitro folosită pentru determinarea sintezei enzimatică a secvențelor specifice de ADN putând pune

astfel în evidență o varietate de dezordini genetice, precum distrofia musculară Duchenne, SMA, etc. Variante diverse ale acestei metode permit identificarea rapidă, eficientă a mutațiilor și studiarea ADN-polimorfismelor [14].

O etapă-cheie a diagnosticului prenatal o reprezintă determinarea genului fătului, care de asemenea se poate stabili prin metoda PCR și anume amplificarea regiunilor specifice ale factorului de azoospermie (AZF a, AZF b și AZF c).

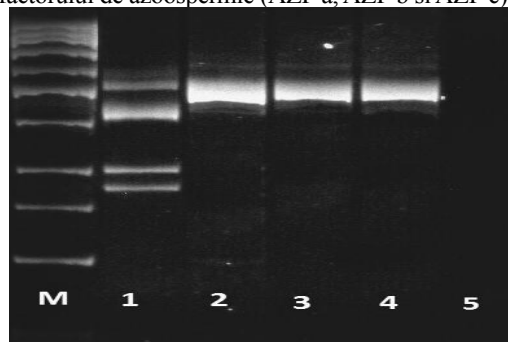


Figura 1: Electroforegrama analizei determinării genului fătului. M- marker O'GeneRuler DNA Ladder; 100-1000 pb(Thermo scientific); 1- control feminin; 2- control masculin; 3,4 – ADN fetal(masculin); 5- control negativ(H₂O)

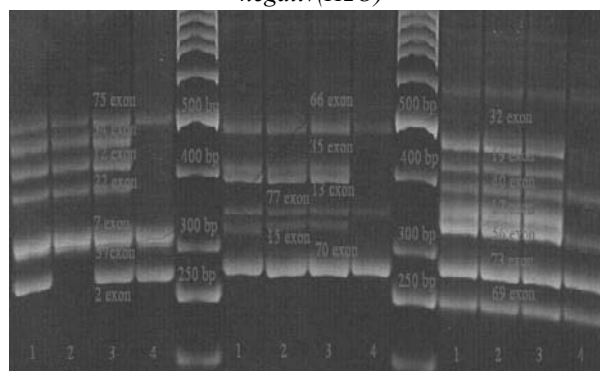


Figura 2: Electroforegrama analizei MPCR a genei distrofinei Track 1,3 – norma; track 2 – deleția exonului 2; track 3 – deleția exonilor 12-35.

Pentru diagnosticul direct al DMD/B s-a realizat PCR multiplex cu primeri specifici de căutare a delețiilor extinse în gena distrofinei (seturile de primeri după Ashton)[2]. Analiza a cuprins 20 exoni { 1,3,4,6,9,17,19,29,31,40,42,43,44,45,47,48,50,51,53,60} (Figura 2). ADN-ul genomic a fost amplificat utilizând polimeraza Dream Taq ("Fermentas", USA), la termocicluul Eppendorf MastercyclerPro (Germania) sub condițiile protocolului standart: denaturare inițială la 95°C 5 minute, 35 cicluri: 94°C 30 secunde, 59°C 45 secunde, 72°C 50 secunde și elongația finală la 72°C 5 minute.

Pentru reacția RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) a locusurilor pERT87-8 și pERT8715 s-a utilizat enzima TaqI pentru a restricționa producția de amplificare timp de 2 ore la 65°C.



Ladder, 100-1000 pb (Thermo scientific); A-amplicon; 1-mama probantului DMD, 2-bolnav DMD, probant; 3-ADN fetal; 4-tatal probantului DMD

Pentru diagnosticul direct al SMA a fost realizat PCR-RFLP cu primeri specifici exonilor 7 și 8 din gena SMN, iar ampliconii au fost restricționați timp de 3 ore la 37°C cu enzima EcoRV pentru exonul 7 și respectiv 3 ore la 65°C cu enzima BseNI pentru exonul 8.

Verificarea produșilor de reacție s-a efectuat prin electroforeză în gel de PAAG (7.5%/4 ore -pentru produșii SMA și polimorfismele pERT87; 8%/17ore- pentru produșii MPCR) cu fotodocumentarea rezultatelor la sistemul de vizualizare UVITEC Cambridge.

Rezultate și discuții. În Republica Moldova diagnosticul maladiilor ereditare neuromusculare și diagnosticul prenatal al acestora se bazează pe metode ca PCR, mPCR, RFLP, electroforeza ce pot detecta mutațiile punctiforme, delețiile sau mutații ce afectează splicing-ul, de exemplu pentru distrofia musculară Duchenne (DMD) sau pentru amiotrofia musculară spinală (SMA) [8].

În perioada 2011-2014 în R.Moldova au fost efectuate 13 diagnostice prenatale conform celor 2 abordări de DP existente:

1. *Diagnostic direct*-bazat pe identificarea nemijlocită a mutațiilor în gena de interes-are o precizie pînă la 100%, nu necesită prezența pacientului bolnav pentru DP și analiza informativității familiei. Este util pentru identificarea mutațiilor majore, are o valoare de diagnostic

mare, dar nu și în cazul mutațiilor minore (sporadice) [13].

2. *Diagnostic indirect*-are la bază analiza site-urilor polimorfice intra- și intergenice. Condiția esențială pentru acest tip de diagnostic este prezența copilului bolnav și/sau posibilitatea investigării ADN-ului său. Determinarea informativității presupune identificarea site-ului polimorfic ce poate fi utilizat ca marker molecular pentru discriminarea alelelor mutante de cele normale. În cazul patologieilor autozomal-recesive; părinții vor fi heterozigoți după acest polimorfism, iar bolnavul-homozigot [14].

Heterozigotivitatea după polimorfisme moleculare determină informativitatea familiei cu risc crescut de naștere a unui copil bolnav. În funcție de amplasarea alelică a markerilor pe cromozomii omologi la pacient și părinții săi, familia poate fi pe deplin informativă, parțial informativă și neinformativă. Metoda indirectă are avantajul diagnosticului fără a identifica mutația în gena respectivă, dar este imposibilă în absența copilului bolnav, întrucît nu e determinată alela polimorfă cu care e linkată gena mutantă [14].

Fiecare diagnostic prenatal se soldează cu 2 opțiuni finale (naștere, întrerupere de sarcină). Astfel, în perioada 2011-2014 au fost realizate un nr de 14 de diagnostice prenatale moleculare genetice a 2 boli și anume a anomaliilor monogenice, X-linkate și respectiv autozomal-recesive: miotrofia Duchenne și amiotrofia musculară spinală.

În scopul realizării efective a analizei ADN și economiei reactivelor utilizate prima etapă de diagnostic prenatal al DMD este determinarea genului [14]. În cazul patologieilor X-linkate analizele ulterioare sunt realizate pentru feteșii masculini. Însă în R. Moldova diagnosticul molecular-genetic este efectuat atât pentru feteșii de gen masculin cât și pentru cei de gen feminin pentru stabilirea purtătorilor heterozigoți [14].

Astfel, analizând datele obținute, din 9 DP efectuate în această perioadă pentru DMD s-a determinat că 6 feteșii sunt de gen feminin și 3 de gen masculin. 2 din feteșii masculini sunt afectați de maladie și în cazul dat s-a realizat întrerupere de sarcină-astfel a avut loc prevenirea nașterii unor copii bolnavi (Tabelul 2).

Tabelul 2

Datele rezultatelor diagnosticului prenatal pe perioada 2011-2014 pentru DMD

MDD	Număr pacienți	Rezultate			Diagnostic	
		MPCR	RFLP pERT87-8/ pERT87-15	Fetal Sex	Prenatal	Postnatal
2011	1	N	A2/A2 (alela mutantă)	46XY	afectat	întrerupere sarcină
	2	n/a	A1A2/A1A2 (alela heterozigotă)	46XX	purtător	naștere
2012	1	N	A2/ A2 (alela mutantă)	46XY	afectat	întrerupere sarcină
	2	n/a	A2/A2 (informativă)	46XX	purtător	naștere
	3	n/a	A2/A1A2 (informativă 17)	46XX	purtător	naștere
2013	1	N	A1/A2 (informativă)	46XY	neafectat	naștere
2014	1	n/a	A2/A2	46XX	purtător	naștere
	2	N	A2/A2 (informativă)	46XY	afectat	întrerupere sarcină
	3	n/a	A1A2/A1A2 (informativă)	46 XX	purtător	naștere

Notă: n/a nu a fost efectuat; XX gen feminin; XY gen masculin; N absența delețiilor; A1, A2 alele ale polimorfismelor

Astfel, pe parcursul a 4 ani faptul că feții sunt purtători de mutație s-a depistat prin diagnosticul indirect al polimorfismelor, diagnosticul direct, prin mPCR, nu a arătat deleții evidente, aceasta ne vorbește despre faptul că DMD poate fi cauzată și de duplicații, mutații punctiforme ș.a.

Astfel de patologii nu pot fi depistate prin mPCR.

Analizând experiența țărilor străine în ceea ce ține de DP al DMD (*Tabelul 3*) și posibilitatea utilizării diferitor metode, noi propunem creșterea efectivității și exactității acestui diagnostic prin utilizarea secvențierii genei distrofinei.

Tabelul 3

Strategii de diagnostic în diferite populații

Populația	Protocol de diagnostic	Discuții
Indiană	Analiza lipidelor din serul pacienților DMD bazată pe rezoluția mare a NMR	Concentrația colesterolului liber și a esterilor colesterolului este semnificativ mai crescută la pacienții cu Duchenne în comparație cu subiecții sănătoși. Aceste date sunt importante pentru diagnosticul DMD, mai ales când diagnosticul genetic nu se reușește.
Americană	Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) urmată de Single condition amplification/internal primer sequencing (SCAIP)	Delețiile și duplicațiile ce nu sunt depistate prin MLPA se supun analizei mai sensibile SCAIP ce poate detecta mutații punctiforme.
Chineză	MLPA combinat cu mPCR și/sau analiza de linkage	MLPA detectează 10 mutații ce nu se observă prin mPCR. Protocolul oferă diagnosticul a 70-80% din toate cazurile menționate
Americană	Hibridizare genomică comparativă de înaltă rezoluție plus microarray	O metodă sensibilă și rapidă de diagnostic.
Europeană	Fluorescence multiplex quantitative PCR followed by Conformation sensitive capillary electrophoresis	Este aplicabilă pentru gene de marimi mari, în special pentru mutații necunoscute, heterogene.
Italiană	Log-PCR ,	Protocol neinvaziv, sensibil, cu rezultate efective, ce detectează mai mult de 85% din mutațiile genice.
Suedeză	Hibridizarea fluorescentă in situ interfazică. (FISH) se utilizează ca analiză utilizând un singur nucleu din blastomeric pentru detecția delețiilor	Detectă embrionii purtători, împreună cu cei afectați și neafectați
Olandeză	Scanarea semiautomată a gelului de electroforeză cu gradient de denaturare (DGGE) împreună cu PCR, ce acoperă 95 de ampliconi	Schimbări subtile în procesul de codificare și splicing a purtătorilor ce nu au deleții largi sau duplicații. Astfel s-au depistat 15 mutații unice.
Multicentrică [americană și olandeză]	Electroforeza gelului de denaturarea de înaltă performanță și secvențierea directă	S-a efectuat screeningul 86 de ampliconi ai genei distrofinei. Se permite depistarea majorității schimbărilor în structura genei cum ar fi: deleții, duplicații, mutații punctiforme și alte restructurări.

Pentru DP al SMA nu este nevoie de determinarea genului, deoarece ea este o maladie autozomal-recisivă, în cazul ei se cere căutarea directă a delețiilor exonilor 7 și 8 ai genei SMN. În peste 95% din cazuri această boală este determinată de anomalii ale genei SMN1 (Survival Motor Neuron 1), ce antrenează un deficit major al proteinei SMN1. Persoanele cu SMA sunt fie homozigote pentru deleția exonului 7 din SMN1 ($\Delta 7$ SMN1), fie heterozigoți compuși pentru $\Delta 7$ SMN1 și o mutație intragenică a SMN1. Deleția copieii telomerice a SMN (SMN1) este

direct implicată în SMA, deoarece absența exonului 7 sau a exonilor 7 și 8 este detectabilă la mai mult de 95% din persoanele afectate, indiferent de forma clinică de manifestare. La pacienții cu mutații, aproximativ 70-80% din produsul genei SMN este sub forma proteinei trunchiate. Toți pacienții cu atrofie musculară spinală păstrează cel puțin o copie a SMN2, însă aceasta este capabilă să genereze doar 10% din cantitatea de SMN full-length necesară, comparativ cu SMN1. Din 5 DP efectuate, doar un făt a fost depistat ca fiind afectat (*Tabel 4*), restul feților fiind sănătoși.

Tabelul 4

Datele rezultatelor diagnosticului prenatal al SMA pe perioada 2012-2014 în RM

SMA	Rezultate		Diagnostic	
	<i>N</i>	<i>RFLP</i>	<i>Prenatal</i>	<i>Postnatal</i>
2012	1	del exon 7; 8	afectat	întrerupere sarcina
	2	N	sănătos	naștere
2013	3	N	sănătos	naștere
	4	N	sănătos	naștere
2014	5	N	sănătos	naștere

Datele din literatura de specialitate arată că implementarea metodelor molecular-genetice de DP contemporan are o eficacitate de 98 %. Conform datelor noastre, eficacitatea DP în R. Moldova a acestor 2 maladii ereditare este de 71,4%.

Conform tabelelor noi atenționăm că numărul de femei supuse DP diferă de la an (2 în 2011) la an (7 în 2014) însă cu trecerea timpului se observă un nivel de informare ridicat și o atitudine mai responsabilă a femeilor însărcinate. Acest fapt se datorează atât activității intense a medicilor, a întregului sistem medical, posibilității de a oferi tuturor persoanelor de orice nivel social a unei consultații cât și interesului familiilor de a avea un copil sănătos.

Diagnosticul prenatal pentru ambele afecțiuni se face în mod standard, conform consultului genetic deoarece la momentul actual nu este posibil de a prezice dacă o femeie însărcinată ce este heterozigotă după o mutație va prezenta sau nu anumite semne ale afecțiunii[7]

În alte țări, ca și în țara noastră, diagnosticul prenatal al acestor patologii este privit ca o șansă de a crea o populație sănătoasă și de a scădea nivelul de naștere a copiilor grav bolnavi, care pot fi aproximativ ½ din copiii analizați, în familiile cu risc crescut[13].

O serie de alte metode și strategii au fost concepute pentru a include detectarea delețiilor mici sau inserțiilor, detectarea mutațiilor ce cauzează DMD și SMA și pentru a ameliora sensibilitatea testului de diagnostic. Metodele utilizate pentru analizele molecular-genetice în diagnosticul prenatal diferă de la o populație la alta, de la o etnie la alta. Diferențele depind de nivelul economic al țării, de religie și politică. Cu toate acestea, multe din aceste tehnici au limite. De exemplu, hibridizarea probelor prin amplificarea multiplexă (MAPH) pe lângă faptul că e simplă și efektivă, necesită o cantitate mare de ADN, iar tehnic este o procedură laborioasă. FISH, CA-analiza repetată a markerilor și QPCR sunt valabile în cazul confirmării persoanelor purtătoare de mutație, însă nu sunt efective pentru screeningul direct al pacienților.

Mai mult, alte metode cum ar fi SSCP (DOVAM-S) și SCALP sunt îndelungate, laborioase și nu pot detecta cu precizie duplicațiile. De asemenea, testul ce determină dacă o femeie este purtătoare este dificil în cazul în care băiatul afectat nu este disponibil (în cazul midistrofiei Duchenne). La rândul ei tehnica PTT pentru diagnosticul de purtător de mutație are limite practice.

Concluzii

1. Diagnosticul prenatal este o strategie importantă și o modalitate eficientă de prevenire a nașterii copiilor cu patologii ereditare monogenice în familia din grupul de risc.
2. Aplicarea metodelor molecular-genetice moderne sporește eficacitatea și precizia diagnosticului prenatal, permite scăderea nașterilor copiilor bolnavi cu SMA și DMD.
3. Datorită activității Laboratorului de Genetică Moleculară Umană pe parcursul ultimilor 4 ani s-a reușit nașterea a 10 copii sănătoși.
4. Eficiența DP în R. Moldova este de 71,4%. Pentru o eficiență mai înaltă se propune implementarea metodelor mai exacte de diagnostic.

5. Dezvoltarea și implementarea metodelor contemporane de diagnostic molecular-genetic în Republica Moldova îmbunătățește asistența genetică, contribuie la ameliorarea calității diagnosticului prenatal.

Bibliografie

1. **Joanne Traeger-Synodinos** Real-time PCR for prenatal and preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 27, Issue 2, Pages 176-191
2. **Alan EH Emery** *The muscular dystrophies*. *The Lancet*, Volume 359, Issue 9307, Pages 687-695
3. **Stylianos E. Antonarakis, John A. Phillips III** *Genetic diseases: Diagnosis by restriction endonuclease analysis*. Original Research Article *The Journal of Pediatrics*, Volume 100, Issue 6, June 1982, Pages 845-856, Haig H. Kazazian Jr
4. <http://www.patient.co.uk/doctor/duchenne-muscular-dystrophy#>
5. <http://sheddoctor.wordpress.com/2008/07/11/diagnosticul-prenatal/>
6. <http://www.childrenshospital.org/health-topics/conditions/spinal-muscular-atrophy-sma>
7. **Dr. Mugdha**, *Genetic etiology and Diagnostic strategies for Duchenne and Becker Muscular Dystrophy: A 2012 update*. *Indian Journal of Basic & Applied Medical Research*; December 2012: Issue-5, Vol.-2, P. 357-369. Potnis-Lele Department of Genetics, Immunology, Biochemistry and Nutrition, Maharashtra University of Health Sciences, 3rd Floor, Aundh Civil Hospital, Aundh, Pune – 411027 Corresponding Author Address: mugdha@lele.com
8. **Shuko Harada and Bruce R. Korf** *Overview of Molecular Genetic Diagnosis*, University of Alabama at Birmingham. Birmingham, Alabama. *Current protocols in Hum. Genet.* 76:9.1.1-9.1.7. January 2013.
9. **Sacără V.** Analiza genetică a genei distrofinei la bărbații bolnavi și femeile purtătoare cu distrofie musculară Duchenne/Becker în Republica Moldova (1992-2012), *Buletin de perinatologie*, 2012, 3 (55), pp.29-35.
10. СПб ГУЗ **Диагностический центр (медико-генетический)**. *Современные алгоритмы пренатальной диагностики наследственных болезней*. Методические рекомендации.. Санкт-Петербург, 2009. ISBN 978-5-94869-073-5
11. **Prof. Dr. Valeriu Popescu, Dr. Andrei Zamfirescu** REVISTA ROMÂNĂ DE PEDIATRIE – VOLUMUL LVIII, NR. 4, 2009:322. *DIAGNOSTICUL PRENATAL* Prenatal diagnosis . Clinica de Pediatrie și Neurologie Pediatrică, Spitalul Clinic de copii „Dr. Victor Gomoiu“, București.
12. **Elaine A Sugarman¹, Narasimhan Nagan^{*}**, Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of 472 400 specimens
13. **Apollonia TJM Helderman-van den Enden^{*,1,4}, Kamlesh Madan¹**, „An urgent need for a change in policy revealed by a study on prenatal testing for Duchenne muscular dystrophy” *European Journal of Human Genetics* (2013) 21, 21–26; doi:10.1038/ejhg.2012.101; published online 6 June 2012.
14. **Scurtu Vitalie**, Strătilă M., Sacără V. „Diagnosticul prenatal al patologiilor neuro-musculare frecvent întâlnite în Republica Moldova.” În: *Patologia malformativă neonatală*/ Maria Stamatina (coord), Petru Stratulat (coord).- Iași: Technopress, 2013. ISBN 978-606-687-022-1