

DOPIS REDAKCI

Neinvasivní prenatální diagnostika nejčastějších chromozomálních aneuploidií – od teorie k praxi

Non invasive prenatal testing of most frequent chromosomal aneuploidies – from the theory to the practice

Jaroslav Loucký, Michal Zemánek
IMALAB s.r.o., Zlín

Korespondenční adresa: RNDr. Jaroslav Loucký, IMALAB s.r.o., U Lomu 638, 760 01 Zlín,
tel.: +420 602 303 098, e-mail: loucky@imalab.cz

Publikováno: 5. 11. 2012 Přijato: 4. 10. 2012 Akceptováno: 30. 10. 2012
Actual Gyn 2012, 4, 99-100 ISSN 1803-9588 © 2012, Aprofema s.r.o.
Článek lze stáhnout z www.actualgyn.com



Citujte tento článek jako: Loucký J, Zemánek M. Neinvasivní prenatální diagnostika nejčastějších chromozomálních aneuploidií – od teorie k praxi. Actual Gyn. 2012;4:99-100

Vážená redakce,

v letech 2008 až 2011 jsme se účastnili mezinárodní klinické validační studie InFANet, která měla za úkol ověřit možnosti zavedení nových, neinvasivních prenatálních postupů, založených na detekci volné DNA plodu v mateřské plazmě.

Díky této účasti a studiu dostupné literatury jsme zjistili, že tento progresivně se rozvíjející obor molekulární biologie má značný potenciál pro budoucnost.

Současné možnosti prenatálního screeningu, díky kombinaci biochemického testování matky s ultrazvukovým vyšetřováním plodu, umožňují vyšší než 90% záchyt nejčastějších chromozomálních aberací. Bohužel u současných screeningových metod je relativně velká část těhotných žen po průchodu screeningem označena jako pozitivní a zpravidla poté absolvuje některou z invazivních procedur, za účelem získání buněk plodu a následně provedení jejich genetické analýzy. Tyto invazivní metody sebou jednak nesou malé, ale objektivní riziko fetální ztráty, a jednak jsou pro mnoho těhotných žen subjektivně velmi nepříjemnou zkušeností.

V roce 1997 byla publikována práce Dennise Lo (1), která poprvé popsala výskyt volné fetální DNA v krevním oběhu matky (cffDNA). Díky tomuto objevu bylo v následujících letech vyvinuto velké úsilí mnoha vědeckých týmů, aby bylo možno tohoto faktu využít pro přímou detekci genetické výbavy plodu prostřednictvím jednoduše realizovatelného odběru krve matky. Fragmenty volné fetální DNA jsou v krevním oběhu matky detekovatelné zhruba od čtvrtého týdne těhotenství. Jejich zastoupení v poměru

k volné mateřské DNA je v průměru kolem 10 % (2). Důležitou vlastností, z hlediska praktického využití, je skutečnost, že doba přetrvávání v mateřské cirkulaci je kolem 24 hodin. V krevním oběhu matky se nacházejí také fetální buňky, ale na rozdíl od volné DNA jsou zastoupeny v mnohem menším poměru k mateřským buňkám a navíc v krvi matky je lze identifikovat až 27 let po porodu plodu (3). Tato skutečnost znemožňuje využití fetálních buněk v neinvasivní prenatální diagnostice, protože nejsme schopni spolehlivě rozlišit, ze kterého těhotenství buňky pocházejí.

Od roku 2008 se naše laboratoře lékařské genetiky Imalab s.r.o. spolu s Centrem prenatální diagnostiky Prediko s.r.o. zapojily do výzkumu v oblasti využití fetálních nukleových kyselin v prenatální diagnostice. Tato studie byla zpočátku označována jako RNA Study. Později, po změně podmínek vyhodnocení, byla přejmenována na InFANet Study. Výzkum byl veden doktorem Jacobem Canickem a doktorem Glennem Palomakim z laboratoří medicínského screeningu a speciálního testování z Department of Pathology and Laboratory Medicine ve Women & Infants Hospital and The Warren Alpert Medical School of Brown University, Providence, Rhode Island, USA a zapojilo se do něj 27 center z celého světa. V rámci výzkumu byla těhotným ženám, podstupujícím na základě vysokého rizika aneuploidie plodu invazivní výkon (CVS či AMC), nabídnuta účast ve studii. Na základě informovaného souhlasu bylo pacientkám odebráno 3x10 ml periferní krve do zkumavky s EDTA. V laboratoři byla následně provedena dvoustupňová separace plazmy. První centrifugace byla provedena při nízkých otáčkách (10 minut při

2.500x g při 4 °C), následována „přečištěním“ plazmy centrifugací při vysokých otáčkách (10 minut při 15.500x g při 4 °C). Alikvoty takto upravené plazmy byly hluboce zamrazeny (-80 °C) a připraveny k zaslání do Women & Infants Hospital v Providence. Celkově bylo v rámci studie vyšetřeno 4.664 těhotných žen, u kterých existovalo zvýšené riziko přítomnosti některé ze sledovaných vývojových vad. Naše pracoviště přispělo 255 vzorky. Detailní hodnocení studie je uvedeno v publikaci autorů Palomaki et al. (4).

Získané výsledky byly na sklonku roku 2011 využity při uvedení prvního komerčního testu Downova syndromu (**MaterniT21™**) americké společnosti Sequenom (<http://www.sequenom.com/home>), založeného na detekci volné fetální DNA, do praxe. V únoru 2012 byl tento test doplněn o detekci trizomie chromozómu 13 a 18 (5, **MaterniT21™ PLUS**). Tyto testy se tak staly prvním příspěvkem k neinvazivnímu prenatálnímu testování (NIPT) nejčastějších chromozomálních aberací. Princip tohoto testování vychází ze skutečnosti, že každý fragment volné DNA lze přiřadit ke konkrétnímu chromozomu. Pokud se zaměříme např. na chromozom 21 a nalezneme vyšší podíl fragmentů odpovídajících tomuto chromozomu, tak můžeme usuzovat, že se jedná o těhotenství s trizomií 21. chromozomu. Proces vyhodnocování je poměrně časově i ekonomicky náročný a v tomto ohledu jej nelze srovnávat s klasickými postupy, které se využívají u současného typu screeningu. Poskytovatel testu, laboratoř SCMM, uvádí, že sensitivity testu je 99,1% (T21), 99,9% (T18), respektive 91,7% (T13). Specificita stanovení je pak 99,9% (T21), 99,6% (T18), respektive 99,7% (T13) (5). Tento test jako jediný dokáže identifikovat uvedené aneuploidie u vícečetných těhotenství (6).

V roce 2011 byly publikovány další práce, které prokázaly, že přítomnost volných fragmentů fetálních nukleových kyselin v krevním oběhu matky lze využít pro detekci nejčastějších chromozomálních aberací. Validační studie Senhert et al. (7) a Bianchi et al. (8) vedly v březnu 2012 k uvolnění testu **Verifi™ prenatal test** americké společnosti Verinata Health (<http://www.verinata.com/>). V červnu 2012 byl pak uveden na trh test **Harmony™ prenatal test** firmy Ariosa diagnostics (<http://www.ariosadx.com/>), opírající se o validační studie Sparks et al. (9) a Norton et al. (10).

Výsledky všech těchto prací ukázaly, že metodou masivního paralelního sekvenování lze odhalit téměř 100 % hledaných chromozomálních aberací, přičemž počet nevyhodnotitelných vzorků (příliš malé množství volné fetální DNA) byl zanedbatelně nízký. Na druhé straně je

třeba uvést, že tyto práce zahrnovaly testování vysoce rizikové populace a pro univerzální použití je třeba provést porovnávací studii na populaci nízkorizikové. Dále je nutné uvést, že kolem zapojení testu do screeningového programu aneuploidií plodu nepanuje jednoznačný konsenzus. Na závazná stanoviska odborných společností se čeká.

Literatura

1. Lo YM, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350(9076):485-487
2. Ehrich M, Deciu C, Zwielfhofer T, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204:205.e1-11
3. Wright C. Cell-free fetal nucleic acids for non-invasive prenatal diagnosis. Report of the UK Expert Working Group. CHG Foundation. Jan 2009
4. Palomaki GE, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study. *Genetics in Medicine*. 2011;13(11):913-920
5. Palomaki GE, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genetics in Medicine*. 2012;14(3):296-305
6. Canick JA, et al. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations. *Prenatal Diagnosis*. 2012;32:730-734
7. Senhert AJ, et al. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clinical Chemistry*. 2011;57(7):1042-1049
8. Bianchi DW, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstetrics&Gynecology*. 2012;119(5):890-901
9. Sparks AB, et al. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *AM J Obstetrics & Gynecology*. 2012;206(4):319.e1-9
10. Norton ME, et al. Non-invasive chromosomal evaluation (NICE) study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *AM J Obstetrics & Gynecology*. 2012;207(2):137.e1-8