

## Genetická analýza z krvi matky

Rastislav Sysák<sup>1</sup>, Peter Štencl<sup>1</sup>, Barbora Izrael Vlková<sup>2</sup>, Katarína Greksová<sup>1</sup>, Viera Oroszová<sup>1</sup>, Marcel Hrebenár<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I. gynekologicko-pôrodnická klinika LFUK a UN Bratislava – Petržalka, Slovenská republika, <sup>2</sup>Ústav molekulárnej biomedicíny LFUK Bratislava, Slovenská republika

Korešpondenčná adresa: MUDr. Rastislav Sysák, PhD., I. gynekologicko-pôrodnická klinika LFUK a UN Bratislava – Petržalka, Antolská 11, 851 07, Bratislava, Slovenská republika, tel.: +421 268 672 726, e-mail: ras.sysak@post.sk

Publikováno: 17. 1. 2014      Prijato: 24. 10. 2013      Akceptováno: 17. 12. 2013  
Actual Gyn 2014, 6, 1-4      ISSN 1803-9588      © 2014, Aprofema s.r.o.  
Článek lze stáhnout z [www.actualgyn.com](http://www.actualgyn.com)



Citujte tento článek jako: Sysák R, Štencl P, Vlková BI, Greksová K, Oroszová V, Hrebenár M. Genetická analýza z krvi matky. Actual Gyn. 2014;6:1-4

## GENETIC ANALYSIS FROM MATERNAL BLOOD

### Review article

#### Abstract

It has been 16 years since there has been a discovery of cell-free fetal DNA (cffDNA) in mother's blood. However in the last 5 years there has been more researching done in the purpose of its specific diagnosis, concentration and molecular size, which have later on reflected into particular tests. These have been available only in the past 2 years. Within the actual trend in preference of non-invasive methods of prenatal diagnosis and its shifting into first trimester the examination of mother's blood has been showing as a very perspective method for early cell-free fetal DNA discovering of chromosome aberration diagnosis of fetus. Its wider enforcement is unfortunately limited by a small amount of studies within non-risk pregnancy groups of patients as well as its higher financial cost. Despite of this information this method is extending further more from United States of America into whole world which lowers its costs and its becoming more accesible for a wider amount of patients.

Within detailed researching in a group of risk pregnancy patients this method could perspectively minimize a risk of fetus loss which is main complication of invasive methods of prenatal diagnosis.

**Key words:** prenatal diagnosis, cell-free fetal DNA, prenatal screening of trisomy 21, 18 and 13, massively parallel sequencing

### Prehľadový článok

#### Abstrakt

Od objavenia mimobunkovej fetálnej DNA v krvi matky uplynulo už 16 rokov. Avšak až v priebehu posledných 5 rokoch prebieha čoraz viac výskumov za účelom stanovenia jej presnej charakteristiky, koncentrácie a molekulárnej veľkosti, ktoré sa neskôr premietli do jednotlivých testov. Tie sú ale dostupné len v posledných 2 rokoch.

Pri aktuálnom trende preferovania neinvazívnych metód prenatalnej diagnostiky a ich posúvania do obdobia prvého trimestra sa stanovenie mimobunkovej fetálnej DNA v krvi matky ukazuje ako veľmi perspektívnou metódou diagnostiky chromozómových aberácií u plodov. Jej širšie uplatnenie je limitované malým počtom štúdií na nerizikových skupinách pacientok a v nemalej miere aj ekonomickou náročnosťou vyšetrenia. Aj napriek tomu sa však táto metóda čoraz viac rozširuje zo Spojených štátov Amerických do celého sveta, čo znižuje náklady na ňu, a stáva sa dostupnejšou pre čoraz väčší počet pacientok.

Ukazuje sa, že táto metóda by v rámci podrobnejšieho vyšetrovania u rizikových pacientok mohla perspektívne minimalizovať riziko fetálnych strát, ktoré sú závažnou komplikáciou invazívnych metód prenatalnej diagnostiky.

**Kľúčové slová:** prenatalná diagnostika, mimobunková fetálna DNA, skríning trizómie 21, 18 a 13, masívna paralelná sekvenácia

## Úvod

Moderná medicína sa snaží pôsobiť preventívnym spôsobom pri odhaľovaní najrôznejších typov ochorení. V tomto smere je dôležitou súčasťou moderného pôrodnictva prenatalná diagnostika. Prenatálna diagnostika je založená na komplexnej spolupráci niekoľkých medicínskych odborov – klinickej genetiky, gynekológie a pôrodnictva, ultrazvukovej diagnostiky a klinickej biochémie. Účelom prenatalnej diagnostiky je vyšetriť genetické vlohy a znaky a potvrdiť eventuálne vylúčiť u plodu zodpovedajúce vrodené alebo geneticky podmienené ochorenia. Aj napriek tomu, že v súčasnosti sa veková indikácia a samotný biochemický skríning považujú za obsolentné, najčastejšími indikáciami k prenatalnej diagnostike na Slovensku je práve pozitívny biochemický skríning, veková indikácia, patologický ultrazvukový nález, prípadne iné dôvody na základe genetického vyšetrenia.

## Metódy prenatalnej diagnostiky

Prenatálna diagnostika vrodených chýb využíva metódy neinvazívne alebo invazívne. Hlavnou neinvazívnou metódou pre matku a plod je ultrazvuková diagnostika s abnormálnym nálezom, pri ktorom je zvýšená suspícia na riziko aneuploídií, prípadne pozitívita kombinovaného event. integrovaného skríningového testu. Ďalšou neinvazívnou metódou, v súčasnosti už ale obsolentnou, bol samotný biochemický skríning tehotných, ktorý slúžil k určeniu zvýšeného rizika vrodených vývojových chýb u plodu. Odchýlky v množstve biochemických látok v zmysle zvýšenia alebo zníženia od referenčných hodnôt, ktoré sú dané pre jednotlivý týždeň vývoja plodu, môžu poukázať na geneticky podmienenú vývojovú chybu plodu alebo ohrozenie plodu vo vnútri maternice bez toho, aby mala matka akékoľvek príznaky ohrozenia v tehotnosti (1). Od roku 2006 platí na Slovensku odborné usmernenie Ministerstva Zdravotníctva Slovenskej republiky č. 4631 – 3/2006 o prenatalnom skríningu vrodených vývojových chýb, ktorý okrem biochemických markerov zo séra tehotnej využíva aj ultrazvukový nález plodu. Ak je skríning pozitívny, vo väčšine prípadov po genetickej konzultácii nasleduje niektorá z invazívnych metód prenatalnej diagnostiky – najčastejšie odber plodovej vody (amniocentéza), v menšom percente prípadov odber choriových klkov (CVS). Takto získané vzorky sú následne spracovávané jedným z nasledovných spôsobov:

- klasická cytogenetická analýza, tj. dlhodobá kultivácia amniocytov, pri ktorej sa vyhodnocujú metafázické chromozómy,
- metóda QF-PCR (quantitative fluorescent polymerase chain reaction), ktorej výsledok je do 12 – 24 hodín,
- metóda FISH (fluorescenčná in situ hybridizácia), ktorej výsledok je na 2. – 5. deň. V súčasnosti sa už táto metóda stáva obsolentnou a je v plnom rozsahu nahrádzaná metódou QF-PCR.

Tieto invazívne metódy prenatalnej diagnostiky sú spojené nielen s nemalými finančnými nákladmi (cena amniocentézy na Slovensku je okolo 300 Eur), ale aj s rizikom straty tehotenstva. Vo všeobecnosti sa toto riziko udáva v rozpätí 0,5 – 1 %. Z tohto dôvodu je v posledných 40 rokoch snaha nájsť čo najefektívnejší skríningový test pre stanovenie rizika najčastejších aneuploídií (2).

Pre mnohé tehotné sú invazívne metódy prenatalnej diagnostiky subjektívne veľmi nepríjemnou skúsenosťou.

## Mimobunková fetálna DNA

Fragmenty voľnej fetálnej DNA sú v krvnom obehú matky detekovateľné zhruba od štvrtého týždňa tehotenstva. Ich zastúpenie v pomere k voľnej materskej DNA je v priemere okolo 10 % (3). Dôležitou vlastnosťou z hľadiska praktického využitia je skutočnosť, že obdobie pretrvávania v materskej cirkulácii je okolo 24 hodín. V krvnom obehú matky sa nachádzajú taktiež fetálne bunky, ale na rozdiel od fetálnej DNA sú zastúpené v omnoho menšom pomere k materským bunkám, a navyše, v krvi matky ich je možné identifikovať až 27 rokov po pôrode plodu (4). Táto skutočnosť znemožňuje využitie fetálnych buniek v neinvazívnej prenatalnej diagnostike, pretože nie sme schopný spoľahlivo rozlíšiť, z ktorého tehotenstva bunky pochádzajú (5).

V roku 1997 bola publikovaná práca Lo a kol. (6), ktorá prvýkrát popísala výskyt voľnej fetálnej DNA (cffDNA) v krvnom obehú matky.

Po tomto objave sa ďalšie práce s touto problematikou začali objavovať s približne 10ročným odstupom. Až v roku 2008 publikovali Chiu a Fan svoje práce, pri ktorých na detekciu chromozómu 21 u tehotných s rizikom trizómie 21 použili metódu masívnej paralelnej sekvenácie (MPS) náhodne vybraných krátkych fragmentov DNA, ktorá bude, zrejme aj z pohľadu hľadania ďalších možných genetických ochorení, univerzálnejším prístupom (7,8). Druhý spôsob získania hľadanej genetickej informácie je založený na cielenej sekvenácii podľa špecifických kritérií vybraných fragmentov DNA z určitej, jednoznačne definovanej oblasti génomu (9).

Palomaki (2011) vo svojej štúdií publikoval možnosti MPS v materskej plazme pri detekcii trizómie 21 s približne 99% senzitivitou a špecificitou u vysoko rizikových tehotností definovaných vekom matky, pozitívnou rodinnou anamnézou alebo pozitívnym biochemickým prípadne sonografickým skríningom (10). Tento istý autor publikoval v roku 2012 výsledky z tejto istej skupiny pacientok, pri ktorej zistil pri trizómii 18 až 100% senzitivitu s falošnou pozitívnosťou 0,28 %. Pri trizómii 13 91,7% senzitivitu s falošnou pozitívnosťou 0,97 %. Ako celkovú senzitivitu MPS pre trizómie 13, 18 a 21 udáva 98,9 % s falošnou pozitívnosťou 1,4 % (11).

Bianchi (2012) rovnako skúmala možnosti MPS v materskej plazme u vysokorizikových tehotných s použitím nepatrne rozdielneho algoritmu analýzy. Zamerala sa aj na

detekciu ďalších autozomálnych a gonozomálnych aneuploidií, ako aj na translokačnú trizómiu a mozaicizmus. Vo svojej štúdií detekovala trizómiu 21 so 100% senzitivitou, trizómiu 18 s 97,2% senzitivitou a trizómiu 13 so 78,6% senzitivitou, vo všetkých prípadoch pri 100% špecificite (12). Všetky uvedené štúdie, a aj mnoho ďalších, poukazujú na vysokú efektívnosť detekcie trizómie 21, trizómie 13 a trizómie 18.

Korabečná (2012) vo svojom príspevku modeluje stav, ako efektívne by mohlo byť neinvazívne testovanie v bežnom populačnom merítku. Podľa jej výpočtov pozitívna prediktívna hodnota testu je v takomto prípade len 64,28 %. Z uvedeného vyplýva, že predkladaný test vzhľadom k malej prevalencii výskytu trizómie 21 v nijak neselektovanej populácii tehotných nespĺňa kritéria kladené na všeobecne využiteľný skriningový test (13).

Spoločným prvkom všetkých doterajších klinických štúdií bola tá skutočnosť, že boli robené na vysokorizikovej populácii. Z tohto dôvodu sa doporučuje používať túto metódu neinvazívnej prenatalnej diagnostiky len u vysokorizikovej populácie a nemala by byť používaná ako rutinný skrining u bežnej, nízkorizikovej populácie (14). V prípade jeho pozitívity by nemal byť tento test považovaný za definitívny. Zvýšené riziko zistené týmto testom je indikáciou, a má byť validované niektorou z metód invazívnej prenatalnej diagnostiky (CVS, amniocentéza) (9).

Predtým, ako sa pacientky s rizikovými faktormi rozhodnú pre test na detekciu fragmentov voľnej fetálnej DNA v krvnom obehú matky, mali by absolvovať genetické vyšetrenie a konzultáciu. Pri tejto konzultácii sa oboznámi s bežnými diagnostickými testami v rámci prenatalnej diagnostiky a taktiež, že detekciu fragmentov voľnej fetálnej DNA nie je možné zistiť všetky chromozomálne a genetické ochorenia (15). Na Slovensku musí byť takáto konzultácia realizovaná klinickým genetikom, v niektorých iných krajinách môže byť takáto konzultácia realizovaná aj osobou zaškolenou do problematiky neinvazívnej prenatalnej diagnostiky.

### Využitie detekcie mimobunkovej fetálnej DNA v praxi

Krajinou s najviac rozšírenou detekciou cffDNA sú Spojené Štáty Americké. V posledných 2 rokoch sa v USA tomto venujú 4 certifikované spoločnosti: Sequenom, Verinata Health, Ariosa Diagnostics a Natera. Pre úspešnú realizáciu testu je vždy požadovaná prítomnosť minimálne 4 % fetálnej voľnej DNA vo vzorke.

**Sequenom** bol prvou spoločnosťou, ktorá v októbri 2011 uviedla na trh test na detekciu cffDNA pri trizómii 21 (MaterniT21) pomocou metódy MPS. Vo februári 2012 bol tento test rozšírený o detekciu trizómie 13 a 18 (MaterniT21 Plus) a vo februári 2013 o detekciu aneuploidií pohlavných chromozómov 45,X – Turnerov syndróm, 47,XXX a 47,YYY a Klinefelterov syndróm XXY. MaterniT21 Plus je použiteľný od 10. týždňa tehotnosti. Sequenom plánuje v priebehu roka zrealizovať cca 120 000 vyšetrení. Cenová hladina za takéto vyšetrenie je v USA 235 \$ pre poistených pacientov a 1700 \$ pre pacientov mimo zdravotného poistenia. Výsledok testu je do 8 – 10 dní (14). Ich test MaterniT21 Plus bol zo začiatku dostupný len v ázijských krajinách (Malajzia, Singapur, Čína) (17). V súčasnosti je už dostupný aj v Európe a najnovšie aj v Českej republike.

**Verinata Health** taktiež používa metódu MPS v ich Verifi teste na detekciu trizómií 13, 18 a 21 a aneuploidií pohlavných chromozómov a navyše aj pohlavia plodu. Rovnako aj tento test je dostupný od 10. týždňa gravidity. Verifi test bol uvedený na trh v marci 2012 a jeho cena sa pohybuje v USA 495 \$ pre poistených pacientov alebo 1200 \$ pre pacientov mimo zdravotného poistenia. Výsledok testu je do 8 – 10 dní (18).

**Ariosa Diagnostics** bola treťou spoločnosťou v USA, ktorá získala licenciu na detekciu cffDNA. Ich Harmony Prenatal Test, ktorý bol uvedený na trh v máji 2012 je založený na cielenej sekvenácii podľa špecifických kritérií vybraných fragmentov DNA z určitej, jednoznačne definovanej oblasti génomu. Používa sa na detekciu trizómií 13, 18 a 21. Dostupnosť testu je od 10. týždňa. Jeho cena je v USA 95 \$ pre poistených pacientov a 795 \$ pre pacientov mimo zdravotného poistenia. Výsledok testu je do 8 – 10 dní (19).

Štvrtou spoločnosťou je **Natera**, ktorá cieľenú sekvenáciu z presne definovanej oblasti génomu zahrnula do svojho Panorama Testu. Tento test bol uvedený na trh v decembri 2012 a používa sa na detekciu trizómií 13, 18 a 21 a aneuploidií pohlavných chromozómov. Dostupnosť testu je od 9. týždňa gravidity. Cena sa pohybuje v USA okolo 1495 \$ a výsledok testu je do 15 dní (20). V súčasnosti spoločnosť pracuje na 2 validačných štúdiách na využitie cffDNA na detekciu mikrodélií a mikroduplicít (21). Od uvedenia všetkých spomínaných testov do klinickej praxe až do súčasnosti došlo k zníženiu ich ceny až o 30 % a v najbližších rokoch je možné očakávať ešte výraznejšie zníženie ceny týchto vyšetrení. V rovine diskusií na etickej úrovni ostáva otázka, či by malo byť spolu s výsledkom testu určené aj pohlavie plodu. Tento záver by totiž mohol u niektorých párov viesť k umelému prerušeniu gravidity z iných ako genetických dôvodov. Z tohto dôvodu je v niektorých krajinách (Čína) určenie pohlavia plodu pri tomto vyšetrení zakázané.

### Záver

V súčasnosti sa na Slovensku veľké percento pacientok so zvýšeným rizikom stanoveným niektorým zo skriningových testov podrobuje niektorej z invazívnych metód prenatalnej diagnostiky, najčastejšie amniocentéze. Najčastejšou indikáciou k intrauterinným invazívnym zákrokom v Bratislavskom kraji v roku 2012 bol pozitívny biochemický skrining (okolo 60 %), potom veková indikácia (okolo 25 %) a na treťom mieste pozitívny ultrazvukový nález (okolo 6 %). Vo veľkom percente prípadov nakoniec amniocentéza dokáže normálny karyotyp plodu. Konkrétne, v roku 2012 bolo na Oddelení klinickej genetiky Lekárskej fakulty UK a Univerzitnej Nemocnice Bratislava - Staré Mesto vyšetrených 457 plodových vôd, z čoho bolo zistených len 19 patologických karyotypov – výťažnosť 4,16 %. To znamená, že až 95,84 % pacientok podstupovalo amniocentézu „zbytočne“ a riskovalo tým stratu plodu. Predpokladáme, že aj na iných pracoviskách lekárskej genetiky nebude v tomto percentuálnom pomere zásadný rozdiel. Medzi príčiny takejto alarmujúcej nízkej výťažnosti je možné zaradiť nízku vekovú hranicu indikujúcu tehotnú na amniocentézu (35 rokov), vysokú falošnú pozitívnosť triple testu, ale najmä nedostupnosť kvalitného prvotrimestrálneho skriningu (FMF štandard). Tento fakt je významný najmä preto, že napriek výborným

výsledkom testovania cffDNA na chromozomálne aberácie, je ultrazvukové vyšetrenie v tehotnosti nenahradiiteľné kvôli iným vrodeným vývojovým chybám.

Ako gynekológovia máme neľahkú úlohu pri konzultáciách s pacientkami pri rozhodovaní sa o invazívnej prenatálnej diagnostike a ešte ťažšiu vtedy, ak ako komplikácia nastane potratenie zdravého plodu. Sprístupnenie neinvazívneho skríningu cffDNA z krvi matky by na Slovensku s určitou pomocou minimalizovať u týchto rizikových skupín riziko fetálnej straty a umožnilo im v tomto smere nekomplikovaný priebeh gravidity.

Niektoré gynekologické pracoviská u nás už začali v tomto smere vyvíjať iniciatívu a sprostredkovane, cez zahraničné laboratóriá lekárskej genetiky, začali posilať vzorky krvi pacientok na analýzu buď do USA alebo Číny. Vzhľadom na veľkosť našej populácie, ekonomické záujmy a ochranu potrebných technológií množstvom patentov je takáto spolupráca asi dlhodobo jedinou reálnou cestou.

## Literatúra

- Hinšt J. Diagnostika stavu plodu v maternici. Zdravý život. 2010;2(4):28-30
- Belošovičová H, Calda P. Triple test po negatívnom kontingenčnom teste, ano či ne? Actual Gyn. 2012;4:87
- Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer 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;204:205:1-11
- Wright C. Cell-free fetal nucleic acids for non-invasive prenatal diagnosis. Report of the UK Expert Working Group. CHG Foundation. Jan 2009
- Loucký J, Zemánek M. Neinvazivní prenatální diagnostika nejčastějších chromozomálních aneuploidii – od teorie k praxi. Actual Gyn. 2012;4:99-100
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet. 1997;350(9076):485-487
- Chiu RW, Chan KC, Gao Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(51):20458-20463
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(42):16266-16271
- Loucký J, Zemánek M. Neinvazivní prenatální diagnostika nejčastějších chromozomálních aneuploidii – některé další aspekty. Actual Gyn. 2013;5:6-7
- Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. Genet Med. 2011;13(11):913-920
- Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. Genet Med. 2012;14(3):296-305
- Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Genome-Wide Fetal Aneuploidy Detection by Maternal Plasma DNA Sequencing. Obstet Gynecol. 2012;119(5):1-13
- Korabečná M. Neinvazivní prenatální diagnostika nejčastějších chromozomálních aneuploidii řečí čísel. Actual Gyn. 2012;4:114-115
- Benn P, Borrell A, Cuckle H, et al. Prenatal Detection of Down Syndrome using Massively Parallel Sequencing (MPS): a rapid response statement from a committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis, 24 October 2011. Prenat Diagn. 2012;32(1):2919
- Devers P, Cronister A, Ormond K, et al. Noninvasive Prenatal Testing/Noninvasive Prenatal Diagnosis: the position of the National Society of Genetic Counselors. NSGC Public Policy Committee. 2012;1:1-12
- Sequenom Launches MaterniT21 Down Syndrome Test as LDT, Publishes Clinical Validation Study. <http://www.genomeweb.com/sequencing/sequenom-launchesmaternit-21-down-syndrome-test-ldt-publishes-clinical-validation>, 2011 Oct 19
- Ashwin A, Lauren C, Sayres MK, et al. Commercial landscape of noninvasive prenatal testing in the United States. Prenat Diagn. 2013;33:521-531
- Non-invasive T21 Testing Space Abuzz as Firms Jockey for Share of \$1B Market, Battle over IP. <http://www.genomeweb.com/mdx/non-invasive-t21-testing-space-abuzz-firms-jockey-share-1b-market-battle-over-ip>, 2012 April 11
- The Harmony Prenatal Test. <http://www.ariosadx.com>, 2012
- Ashford M. Natera Publishes Details on Noninvasive Prenatal Sequencing Method, Updates Analysis Algorithm. <http://www.genomeweb.com/clinical-genomics/natera-publishes-details-noninvasive-prenatal-sequencing-method-updates-analysis>, 2012 Nov 14
- Jefferies Upgrades Sequenom Citing Reimbursement Traction with US Insurers. <http://www.genomeweb.com/sequencing/jefferies-upgrades-sequenom-citing-reimbursement-traction-us-insurers>, 2012 Nov 12