

Nieinwazyjny test NIFTY w diagnostyce najczęstszych trisomii chromosomowych u płodu

Non-invasive Fetal Trisomy (NIFTY) test in prenatal diagnosis

Izabela Łaczmńska*, Agnieszka Stembalska*

* równy udział autorów w przygotowaniu publikacji
Katedra i Zakład Genetyki, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska

Streszczenie

NIFTY (Noninvasive Fetal Trisomy test) jest nieinwazyjnym testem prenatalnym, który służy do diagnostyki trisomii u płodu. Test opiera się na analizie DNA płodu (cffDNA) obecnego w osoczu i surowicy kobiety ciężarnej. W chwili obecnej umożliwia wykrycie u płodu trisomii chromosomów 13, 18, 21, X i Y oraz monosomii chromosomu X. Wyniki nieprawidłowe uzyskane za pomocą testu NIFTY wciąż jeszcze muszą być weryfikowane przy użyciu innych technik diagnostycznych, niemniej czułość testu dla trisomii 21 ocenia się na 99%, dla trisomii 18 na 97% a trisomii 13 na 79%, zaś odsetek wyników fałszywie dodatnich dla wszystkich badanych trisomii i monosomii X mieści się poniżej 1%. Obecnie NIFTY jest dostępny w Polsce odpłatnie, stosowany, jako dobre badanie przesiewowe dla trisomii, które wykonuje się obok badania USG i testów biochemicznych, w przypadku niepokoju pacjentki, a także w sytuacji, gdy pacjentka nie decyduje się na wykonanie diagnostyki inwazyjnej.

Czułość i specyficzność NIFTY zapewne będą ulegały poprawie w miarę doskonalenia metody oraz przeprowadzenia badań na dostatecznie dużej grupie pacjentek, dlatego test ten w niedalekiej przyszłości ma szansę stać się podstawowym testem diagnostycznym dla najczęstszych trisomii, pozwalającym na rezygnację z badań inwazyjnych zleczanych w tym kierunku.

Z dużym prawdopodobieństwem cffDNA uzyskiwany z surowicy kobiety ciężarnej będzie także wykorzystywany w diagnostyce zmian strukturalnych i genowych u płodu.

Celem pracy jest przedstawienie nowej metody diagnostycznej.

Słowa kluczowe: **nieinwazyjna diagnostyka prenatalna / NIFTY / trisomia /**

Adres do korespondencji:

Izabela Łaczmńska
Katedra i Zakład Genetyki, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Marcinkowskiego 1, 50-368 Wrocław,
tel.: 71 784 12 56, fax: 71 784 00 63
e-mail: izabela.laczmanska@umed.wroc.pl

Otrzymano: **11.06.2013**
Zaakceptowano do druku: **30.10.2013**

Izabela Łaczmarska, Agnieszka Stembalska. Nieinwazyjny test NIFTY w diagnostyce najczęstszych trisomii chromosomowych u płodu.

Abstract

NIFTY (Non-invasive Fetal Trisomy Test) is a non-invasive prenatal test which is used for diagnosing fetal trisomy. The test is based on the analysis of cell free fetal DNA (cffDNA) present in the plasma and serum of a pregnant woman. NIFTY allows to detect fetal trisomy of chromosomes 13, 18, 21, X and Y and also X monosomy. Abnormal NIFTY results still need to be verified using other diagnostic techniques. However, the sensitivity of NIFTY for trisomy 21, 18 and 13 is estimated at 99%, 97% and 79% respectively, with false positive rate for all examined trisomies and X monosomy of <1%.

NIFTY is currently available in Poland as a commercial service, used as a good screening test for common trisomies (apart from ultrasound and biochemical tests) in the case of patient anxiety, and in situation when the patient does not consent to invasive prenatal diagnostic tests. The sensitivity and specificity of NIFTY will most likely be improved as laboratory methods develop, and after a sufficiently large group of pregnant patients has been tested. Therefore, this test may soon become the primary diagnostic tool for common trisomies, allowing to avoid invasive prenatal testing in this indication.

With high probability, cffDNA obtained from the serum of pregnant women will also be used with time in the diagnosis of fetal structural chromosomal aberrations and other genetic changes.

The aim of our study is to present a new diagnostic method.

Key words: **non-invasive prenatal diagnostics / NIFTY / trisomy /**

Wstęp

Aberracje chromosomowe stwierdzane u około 6,5% żywo urodzonych dzieci z wadami rozwojowymi, odpowiadają za ok. 6-11% martwych urodzeń/zgonów w okresie noworodkowym [1, 2]. Badania prenatalne, dotychczas stosowane w wykrywaniu najczęstszych liczbowych aberracji chromosomowych płodu, są albo 1) nieinwazyjne (nie ingerują w środowisko płodu, są bezpieczne) i przesiewowe (nie mają 100% czułości), albo 2) inwazyjne (ingerują w środowisko płodu, niosą ryzyko powikłań) i w pełni diagnostyczne.

Najczęściej wykonywanym w chwili obecnej prenatalnym testem nieinwazyjnym jest badanie przesiewowe I trymestru (FTS, *first trimester screening test*), oparte na połączeniu badania ultrasonograficznego i badania biochemicznego w surowicy kobiety ciężarnej, które zgodnie z rekomendacjami Fundacji Medycyny Płodowej (*Fetal Medicin Foundation*) przeprowadzany jest w 11⁺⁰-13⁺⁶ tygodniu ciąży, przy długości ciemieniowo-siedzeniowej płodu (CRL, *crown-rump length*) wynoszącej 45 do 84 mm. Test opiera się na analizie wieku matki, przezierności karkowej płodu (NT, *nuchal translucency*) oraz markerów biochemicznych (wolnej podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej – beta hCG, *free beta human chronic gonadotropin* oraz specyficznego dla ciąży białka A - PAPP-A, *pregnancy-associated plasma protein A*). Czułość testu w odniesieniu do trisomii chromosomu 21 wynosi 90% (dla trisomii 13, 18–95%), a odsetek wyników fałszywie pozytywnych nie przekracza 5% [3, 4]. Wprowadzenie do oceny dodatkowych markerów ultrasonograficznych, stopień kostnienia kości nosowej płodu czy ocena przepływów krwi przez zastawkę trójdzielną i przewod żylny może zwiększyć czułość testu dla trisomii 21 do 95% i zmniejszyć odsetek wyników fałszywie pozytywnych do 3% [3, 4].

Niewątpliwą zaletą prenatalnych badań przesiewowych jest ich nieinwazyjność a tym samym brak ryzyka powikłań dla płodu. Wadą metody przesiewowej jest jej ograniczona wartość diagnostyczna. Każde z badań tego typu ma określoną czułość

i opiera się na statystycznej ocenie ryzyka wystąpienia danych nieprawidłowości u płodu. Metody przesiewowe traktowane są jako pośrednie, które przy wynikach wskazujących na wysokie ryzyko aberracji liczbowych płodu, wymagają zastosowania inwazyjnych badań prenatalnych, w których ocenia się kariotyp płodu z komórek trofoblastu, komórek płynu owodniowego lub krwi płodu [3].

W krajach rozwiniętych i rozwijających od wielu lat obserwuje się podwyższanie średniego wieku pacjentek będących w ciąży. Na podstawie analizy danych z lat 1989-2008 w Wielkiej Brytanii oszacowano, że ponad 20% ciąż dotyczy kobiet starszych niż 35 lat, co zwiększa koszty diagnostyki zarówno nieinwazyjnej, jak i inwazyjnej wykonywanej w takich przypadkach [5].

Podwyższenie wieku kobiet ciężarnych pociąga za sobą wzrost częstości występowania aneuploidii u płodów. Tendencje te wraz ze wzrostem świadomości i oczekiwań pacjentek generują zapotrzebowanie na stworzenie nowego testu prenatalnego, który powinien być nieinwazyjny, bezpieczny i powinien umożliwiać wykrycie najczęściej występujących zmian genetycznych płodu.

Dzięki odkryciu Lo YMD i in. w 1997 roku wolnego DNA płodu (cffDNA – *cell free fetal DNA*, lub *fetal cfDNA*), krążącego we krwi kobiety ciężarnej, pojawiła się perspektywa stworzenia nowego testu prenatalnego, który byłby bezpieczny dla pacjentki i płodu oraz charakteryzowałby się wysoką czułością i bardzo niskim odsetkiem wyników fałszywie dodatnich. Takim testem stał się w ostatnich latach test NIFTY (**N**on**i**nvasive **F**etal **T**risomy **T**est). Czułość testu została oceniona przez różne grupy badawcze. Dla zespołu Downa wynosi ona ponad 99%, a odsetek wyników fałszywie dodatnich 0,1%, dla zespołu Edwardsa – 97% z odsetkiem wyników fałszywie dodatnich 0,1%, a dla zespołu Patau – 79% i 0,4% [4,6]. W innych badaniach określono czułość testu na 100%, a specyficzność na 99,9% dla trisomii autosomalnych i 85,7% i 99,9% dla aneuploidii chromosomów płci [7]. Wartości te będą zapewne ulegały poprawie w miarę doskonalenia metody oraz przeprowadzenia badań na dostatecznie dużej grupie pacjentek.

Izabela Łączmańska, Agnieszka Stembalska. Nieinwazyjny test NIFTY w diagnostyce najczęstszych trisomii chromosomowych u płodu.

Test jest oferowany pacjentkom w wielu krajach, także w Polsce, choć w przypadku Polski oferowane badania wykonywane są za granicą.

Celem pracy jest przedstawienie nowej metody nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej trisomii chromosomowych.

NIFTY – Noninvasive Fetal Trisomy test

Test NIFTY w chwili obecnej umożliwia wykrycie u płodu najczęstszych trisomii (aberracji liczbowych) na podstawie analizy DNA płodowego (cffDNA), który jest obecny w osoczu i surowicy kobiety ciężarnej. Początkowo test NIFTY służył tylko do diagnostyki trisomii chromosomu 21 (zespołu Downa), stąd zresztą nazwa testu NIFTY (nieinwazyjny test prenatalny w kierunku trisomii płodu). Obecnie test wykorzystywany jest także do wykrywania aneuploidii chromosomów 13 i 18 oraz X i Y (choć ta opcja nie jest jeszcze oferowana w Polsce). Test jest zalecany dla ciąży pojedynczych, brak danych w chwili obecnej o możliwościach stosowania go w przypadkach ciąży mnogich [4].

Diagnostyka trisomii z użyciem cffDNA możliwa jest dzięki pobraniu krwi od kobiety ciężarnej, izolacji cffDNA (w tym płodowego cffDNA) standardowymi metodami i zastosowaniu jednej z metod molekularnych pozwalających na identyfikację i badanie DNA płodu: ilościowej – MPS (*Massively Parallel Sequencing* – masywne równoległe sekwencjonowanie) lub opartej na analizie SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* – polimorfizm pojedynczego nukleotydu). W metodzie ilościowej MPS każdy zsekwenconowany fragment cffDNA jest dopasowywany do ludzkiego genomu za pomocą baz danych. Wykorzystanie zaawansowanych programów do analizy statystycznej umożliwia określenie ilości poszczególnych fragmentów DNA dla badanych chromosomów w porównaniu do fragmentów DNA dla chromosomów referencyjnych o prawidłowej liczbie [4]. Metoda oparta na analizie SNP pozwala na określenie liczby chromosomów poprzez celowane sekwencjonowanie i analizę około 20 000 różnych SNP na chromosomach 13, 21, 18, X i Y oraz poprzez określenie specyficznych układów/dystrybucji poszczególnych alleli [4].

Płodowe DNA obecne w osoczu i surowicy kobiety ciężarnej (także moczu) umożliwia przeprowadzenie nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej z wysoką czułością bez narażenia ciąży na niekorzystne zdarzenia [4,7,8]. Cząsteczki cffDNA pojawiające się w osoczu ciężarnej na skutek dwukierunkowej wymiany cffDNA pomiędzy płodem a matką stanowią od 3,4% (we wczesnej ciąży) do 6,2% (w późnej ciąży) całkowitego wolnego DNA (cfDNA) obecnego w osoczu ciężarnej [5]. Cząsteczki wolnego płodowego DNA są krótkie (długości kilkudziesięciu nukleotydów) oraz bardziej pofragmentowane niż cząsteczki wolnego DNA matczynego [9, 10]. Płodowy cfDNA pochodzi najprawdopodobniej z komórek łożyska, które przeszły apoptozę (kontrolowana śmierć komórki). Większość cffDNA krąży zamknięta w ciałkach apoptotycznych [9]. Obecność cffDNA w osoczu została potwierdzona już w 32 dniu od zapłodnienia. Zaobserwowano też wzrost jego ilości w miarę postępu ciąży, w pierwszym trymestrze o 21% na każdy tydzień ciąży [11]. Wzrost stężenia cffDNA ponad przeciętną może być wyznacznikiem stanu łożyska i złamania bariery przenikania przez łożysko. Wzrost stężenia płodowego DNA wiąże się z takimi stanami patologicznymi, jak poronienie, przedwczesne pęknięcie błon płodowych, poród przedwczesny, stan przedzucawkowy (wzrost stężenia cffDNA może tu być czynnikiem prognostycznym) i łożyska inwazyjnego

[9]. Opisano także zależność między stężeniem cffDNA i występowaniem trisomii chromosomów, m.in. 13, 18 i 21. CffDNA z osocza ciężarnej może być wykorzystany także do wielu innych testów genetycznych, np. kariotypowania molekularnego za pomocą masywnego równoległego sekwencjonowania, co pozwala na zbadanie wszystkich zmian ilościowych w płodowym genomie z rozdzielczością około 3Mpz, w tym wszystkich zespołów mikrodelecyjnych i mikroduplikacyjnych. W przyszłości metoda ta może być wykorzystana do badania pojedynczych genów, egzonów czy nukleotydów, możliwa więc będzie diagnostyka także chorób monogenowych [12, 13].

Opracowanie i wprowadzenie do diagnostyki prenatalnej nieinwazyjnego testu o wysokiej czułości i specyficzności, który mógłby zastąpić badanie inwazyjne niesie ze sobą niekwestionowane korzyści zarówno dla płodu, jego rodziców, a także lekarza prowadzącego ciążę. Obecnie, ostatecznym badaniem genetycznym płodu potwierdzającym lub wykluczającym obecność trisomii jest badanie cytogenetyczne (oznaczenie kariotypu). Badanie to wykonywane jest najczęściej z wykorzystaniem amniocytów z płynu owodniowego uzyskiwanego podczas amniopunkcji, co wiąże się z około 0,5-1% ryzykiem powikłań, m.in. ryzykiem poronienia [14]. Ponieważ rozdzielczość prenatalnego badania cytogenetycznego umożliwia wykrycie zmian rzędu 7-10 milionów par zasad, badanie takie, obok diagnostyki aberracji liczbowych chromosomów, służy także do diagnostyki dużych aberracji strukturalnych. Wadami badania cytogenetycznego są: 1) długi czas oczekiwania na wynik, wynoszący około 2-3 tygodni, a który jest związany z koniecznością prowadzenia hodowli komórkowych oraz 3) ograniczenia techniczne (rozdzielczość i zakres badania związany ze wskazaniami do jego wykonania) [15].

Test NIFTY jest stosowany w wielu krajach, jako test przesiewowy pierwszego trymestru, który może być bez ryzyka powikłań oferowany każdej kobiecie w ciąży. Wynik przeprowadzonego testu otrzymuje pacjentka po kilku dniach od pobrania krwi. Wadami testu na dzień dzisiejszy są jego cena i jak na razie konieczność weryfikacji uzyskanych nieprawidłowych wyników innymi metodami diagnostycznymi, a ograniczeniem badania może być w niektórych przypadkach zbyt mała ilość cffDNA uzyskanego z surowicy kobiety ciężarnej [4]. Test NIFTY jest testem nowym, wszedł do użytku klinicznego w ostatnich 2-3 latach, stale trwają prace nad jego udoskonaleniem, nie traktuje się go jako testu ostatecznego, samowystarczalnego [4]. Pozytywne wyniki testu, zwłaszcza te, które stwierdzane są u kobiet, u których nie obserwowano dodatkowych nieprawidłowych markerów USG lub/i biochemicznych, są potwierdzane badaniem cytogenetycznym [4, 6, 7, 16]. Jednakże dokładność testu NIFTY i fakt, że badane jest DNA płodu, a nie czynniki mogące świadczyć o trisomii (stężenia białek, markery USG), sugerują, że w ciągu kilku lat test ten stanie się podstawowym badaniem, które pozwoli na odstępianie od procedur inwazyjnej diagnostyki prenatalnej. Jak na razie NIFTY nie jest polecany w ciążach wysokiego ryzyka (markery USG i biochemiczne charakterystyczne dla trisomii) – nie jest to badanie o 100% czułości, oraz w przypadku podejrzenia wady u płodu innej niż trisomia, której NIFTY nie wykryje [6]. Jednocześnie test ten jest bardzo dobrym rozwiązaniem dla kobiet z ujemnym wynikiem nieinwazyjnego testu przesiewowego, lub dla kobiet, które nie chcą decydować się na diagnostykę inwazyjną, a zwłaszcza w przypadku dużego niepokoju pacjentki [16].

Izabela Łaczmńska, Agnieszka Stembalska. Nieinwazyjny test NIFTY w diagnostyce najczęstszych trisomii chromosomowych u płodu.

Jego powszechne wprowadzenie pozwoli na obniżenie kosztów analizy i skrócenie czasu oczekiwania na wynik - w Polsce to obecnie około 2 500 zł i 3 tygodnie - test jest wykonywany poza granicami kraju.

Podsumowanie

Rosnące zapotrzebowanie społeczne na bezpieczne i miarodajne metody diagnostyki prenatalnej jest przyczyną pojawiania się na rynku diagnostycznym coraz nowszych i dokładniejszych metod. NIFTY z czułością 99% i odsetkiem wyników fałszywie dodatnich około 0,1% jest testem, który z dużym prawdopodobieństwem stanie się podstawowym prenatalnym badaniem nieinwazyjnym także w Polsce.

Oświadczenie autorów

1. Izabela Łaczmńska - równy udział w przygotowywaniu pracy - autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Agnieszka Stembalska - równy udział w przygotowywaniu pracy.

Źródło finansowania: Praca nie była finansowana przez żadną instytucję naukowo-badawczą, stowarzyszenie ani inny podmiot, autorzy nie otrzymali żadnego grantu.

Konflikt interesów: Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Polski Rejestr Wrodzonych Wad rozwojowych - <http://www.rejestrwad.pl/>
2. Dan S, Chen F, Choy KW, [et al.]. Prenatal detection of aneuploidy and imbalanced chromosomal arrangements by massively parallel sequencing. *PLoS One*. 2012, 7 (2), e27835.
3. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące postępowania w zakresie diagnostyki prenatalnej. *Ginekol Pol*. 2009, 80, 390-393.
4. Nicolaidis KH, Syngelaki A, Gil M, [et al.]. Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn*. 2013, 33 (6), 575-579.
5. Hahn S, Lapaire O, Tercanli S, [et al.]. Determination of fetal chromosome aberrations from fetal DNA in maternal blood: has the challenge finally been met? *Expert Rev Mol Med*. 2011, 4, 13, e16.
6. Lau TK, Chan MK, Lo PS, [et al.]. Clinical utility of noninvasive fetal trisomy (NIFTY) test--early experience. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012, 25 (10), 1856-1859.
7. Jiang F, Ren J, Chen F, [et al.]. Noninvasive Fetal Trisomy (NIFTY) test: an advanced noninvasive prenatal diagnosis methodology for fetal autosomal and sex chromosomal aneuploidies. *BMC Med Genomics*. 2012, 1 (5), 57.
8. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, [et al.]. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997, 350 (9076), 485-487.
9. Bauer M, Hutterer G, Eder M, [et al.]. A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn*. 2006, 26 (9), 831-836.
10. Tsui NB, Jiang P, Chow KC, [et al.]. High resolution size analysis of fetal DNA in the urine of pregnant women by paired-end massively parallel sequencing. *PLoS One*. 2012, 7 (10), e48319.
11. Wataganara T, Chen AY, LeShane ES, [et al.]. Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first-trimester termination of pregnancy. *Fertil Steril*. 2004, 81 (3), 638-644.
12. Yu SC, Jiang P, Choy KW, [et al.]. Noninvasive prenatal molecular karyotyping from maternal plasma. *PLoS One*. 2013, 8 (4), e60968.
13. Chen S, Ge H, Wang X, [et al.]. Haplotype-assisted accurate noninvasive fetal whole genome recovery through maternal plasma sequencing. *Genome Med*. 2013, 5 (2), 18.
14. Stembalska A, Slezak R, Pesz K, [et al.]. Prenatal diagnosis--principles of diagnostic procedures and genetic counseling. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007, 45, Suppl 1, 11-16.
15. Bocian E. Prenatalna diagnostyka cytogenetyczna chorób genetycznych. Klasyfikacja metody i zasady oceny kariotypu. *Med Sci Rev Genet*. 2004, 27-33.
16. Chetty S, Garabedian MJ, Norton ME. Uptake of noninvasive prenatal testing (NIPT) in women following positive aneuploidy screening. *Prenat Diagn*. 2013, 33 (6), 542-546.

KOMUNIKAT



International Society of Ultrasound
in Obstetrics & Gynecology



European Association
of Perinatal Medicine



Ultrasound Section of Polish
Society of Gynecology

International Society of Ultrasound in Obstetrics & Gynecology - ISUOG
European Association of Perinatal Medicine

oraz

Sekcja USG PTG

zapraszają
w dniach 9-10.05.2014

„MATERNAL - FETAL HEMODYNAMICS”

(prezentacja przypadków „live”, tłumaczenie simultaniczne)

Wykładowcy:

Członkowie ISUOG z całej Europy

Kierownik Kursu:

MARIUSZ DUBIEL (ISUOG - Polska)
MAREK PIETRYGA (ISUOG - Polska)

Miejsce obrad: Toruń

Zgłoszenia:

www.regomed.pl
tel. 663 064 000

Uczestnicy Kursu otrzymają certyfikat uczestnictwa
International Society of Ultrasound in Obstetrics & Gynecology - ISUOG

oraz

30 punktów edukacyjnych USG PTG

