

Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna najczęstszych aneuploidii na podstawie płodowego DNA we krwi matki – doniesienie wstępne

Non-invasive prenatal diagnosis of the most common aneuploidies with cell-free fetal DNA in maternal serum – preliminary results

Julia Bijok¹, Katarzyna Gorzelnik¹, Diana Massalska¹, Alicja Ilnicka², Barbara Pawłowska², Janusz G. Zimowski², Anna Kucińska-Chahwan^{1,2}, Grzegorz Jakiel^{1,3}, Tomasz Roszkowski^{1,3}

¹ Oddział Kliniczny Położnictwa i Ginekologii, SPSK im. Prof. Orłowskiego w Warszawie, Polska

² Zakład Genetyki, Instytut Psychiatrii i Neurologii w Warszawie, Polska

³ I Klinika Ginekologii i Położnictwa – CMKP SPSK im. Prof. Orłowskiego w Warszawie, Polska

Streszczenie

Cel pracy: Wstępne przedstawienie wyników wykorzystania płodowego DNA z krwi matki w nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej aneuploidii chromosomów 21, 18 i 13 u pacjentek wysokiego ryzyka aberracji chromosomowych u płodu oraz ich porównanie z wynikami klasycznego badania cytogenetycznego.

Materiał i metoda: Od dziesięciu ciężarnych pacjentek przed wykonaniem badania inwazyjnego pobrano 10 ml krwi obwodowej celem izolacji pozakomórkowego DNA płodu (cffDNA – cell free fetal DNA) i przeprowadzenia testu NIFTY (Non-Invasive Fetal Trisomy Test; Beijing Genomics Institute, BGI, Shenzhen, China).

Wyniki: W trzech z dziesięciu próbek w badaniu cytogenetycznym stwierdzono nieprawidłowy kariotyp płodu. Na podstawie płodowego DNA z dziewięciu próbek osocza za pomocą testu NIFTY udało się określić ryzyko aneuploidii u płodu. Wysokie ryzyko aneuploidii prawidłowo oceniono w jednym z dwóch przypadków trisomii chromosomu 18. W drugiej próbce podejrzewano wysokie ryzyko trisomii chromosomu 18, ale ilość cffDNA była zbyt mała, aby wynik spełniał standardy producenta. Wykryty w badaniu cytogenetycznym kariotyp mozaikowy z założenia nie mógł zostać wykryty metodą nieinwazyjną.

Wnioski: Płodowe DNA z krwi matki może służyć do wykrywania najczęstszych aneuploidii u płodu. Test mógłby posłużyć jako badanie przesiewowe II rzutu, prowadząc do zmniejszenia liczby pacjentek poddawanych badaniu inwazyjnemu.

Słowa kluczowe: **nieinwazyjna diagnostyka prenatalna / pozakomórkowe płodowe DNA / aberracje chromosomowe / NIFTY / cffDNA /**

Adres do korespondencji:

Julia Bijok

I Klinika Ginekologii i Położnictwa – CMKP SPSK im. Prof. Orłowskiego w Warszawie

ul. Czerniakowska 231, 00-416 Warszawa, Polska

e-mail: julia.bijok@gmail.com

Otrzymano: 31.07.2013

Zaakceptowano do druku: 15.12.2013

Julia Bijok et al. Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna najczęstszych aneuploidii na podstawie płodowego DNA we krwi matki – doniesienie wstępne.

Abstract

Objectives: The aim of the study was to present initial results of non-invasive prenatal diagnosis of common aneuploidies of chromosomes 21, 18 and 13 based on cell-free fetal DNA in maternal serum in high-risk patients, and to compare the results with routine karyotyping.

Material and methods: Before the invasive procedure, 10 ml of peripheral blood from 10 patients was collected to isolate cell-free fetal DNA and to perform a non-invasive fetal trisomy test (NIFTY provided by Beijing Genomics Institute, BGI, Shenzhen, China).

Results: Three out of 10 samples showed an abnormal karyotype in traditional karyotyping. There were 9 conclusive NIFTY results. NIFTY detected 1 out of 2 trisomies 18. The quantity of cell-free fetal DNA in maternal plasma in the second probe with trisomy 18 was unsatisfactory for a conclusive NIFTY result. In 1 case traditional karyotyping revealed mosaicism impossible to detect with NIFTY.

Key words: **non-invasive prenatal diagnosis – NIPD / cell free fetal DNA – cffDNA /
/ chromosomal aberrations / non-invasive fetal trisomy test – NIFTY /**

Wprowadzenie

Aberracje chromosomowe, czyli zaburzenia struktury lub/i liczby chromosomów, występując u płodu, mogą powodować zwiększone ryzyko poronienia, wewnątrzmacicznego obumarcia, zgonu lub wystąpienia wad wrodzonych i niepełnosprawności intelektualnej po urodzeniu. Głównym celem przesiewowych badań prenatalnych jest wykrywanie najczęściej występujących aberracji, czyli trisomii chromosomów 21, 18 i 13 [1].

Obecnie stosowana nieinwazyjna diagnostyka prenatalna zespołu Downa (trisomia 21), Edwardsa (trisomia 18) i Patau (trisomia 13) oparta jest na badaniu USG między 11 t.c. a 13 + 6 t.c. według standardów *Fetal Medicine Foundation* oraz oznaczeniu poziomu

PAPP-A i β -hCG w surowicy ciężarnej. Satisfakcjonującą czułość badania (ponad 90%) uzyskuje się przy założeniu stosunkowo wysokiego odsetka wyników dodatnich (5%) [1, 2, 3, 4], które są wskazaniem do wykonania badania rozstrzygającego - oznaczenia kariotypu płodu konwencjonalną metodą cytogenetyczną. Niesie to za sobą potrzebę pobrania materiału genetycznego płodu metodą inwazyjną (amniopunkcja, biopsja kosmówki), które jest związane z ryzykiem straty ciąży, wynoszącym ok. 0,5-1% [5, 6]. W większości przypadków ryzyko to podejmowane jest niepotrzebnie, w oparciu o fałszywie dodatni wynik nieinwazyjnych badań przesiewowych. Wdrożenie nieinwazyjnego testu prenatalnego o wyższej czułości i swoistości pozwoliłoby zmniejszyć grupę pacjentek, poddawanych badaniu inwazyjnemu, obciążonemu ryzykiem powikłań.

W 1969 r. pojawiło się pierwsze doniesienie na temat obecności limfocytów płodu w surowicy ciężarnej [7]. Niewielka ilość płodowych komórek we krwi matki oraz ich trudna izolacja uniemożliwiły jednak wykorzystanie uzyskanego w ten sposób DNA płodu w praktyce klinicznej.

Przełomem w nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej stało się wykrycie pochodzących od płodu fragmentów DNA krążących w osoczu ciężarnej w postaci wolnej [8]. Pozakomórkowe DNA płodu (cffDNA – *cell free fetal DNA*) pochodzi z ulegających apoptozie komórek łożyska i jest możliwe do wykrycia już od 4-7 tygodnia ciąży. Stanowi ok.10% całkowitej puli wolnego

DNA (cffDNA – *cell free DNA*) we krwi ciężarnej [9]. Jego okres półtrwania wynosi ok. 30 min, dzięki czemu jest eliminowane z krążenia matki bezpośrednio po porodzie i jest swoiste dla danej ciąży.

Stwierdzenie obecności we krwi matki wolnego materiału genetycznego płodu umożliwiło wdrożenie nieinwazyjnych testów, określających obecność czynnika Rh oraz płęć płodu, stosowanych w diagnostyce konfliktu serologicznego oraz chorób sprzężonych z płcią [10]. Badania te opierają się na wykrywaniu we krwi matki fragmentów DNA swoistych dla płodu, które w normalnych warunkach nie powinny być u kobiety obecne (sekwencji z chromosomu Y, mutacji obecnej w genomie ojca lub nowopowstałej mutacji) [11].

Nieinwazyjna diagnostyka aneuploidii na podstawie płodowego DNA we krwi matki stanowiła do niedawna poważne wyzwanie. Głównym problemem było wyodrębnienie płodowego materiału genetycznego i jego ocena ilościowa. Trudności te spowodowane były obecnością we krwi ciężarnej jedynie bardzo krótkich, pociętych fragmentów DNA płodowego oraz względnie małą ich ilością w stosunku do wolnego DNA matki [11].

Wprowadzenie w 2005 r. techniki masywnego równoległego sekwencjonowania (ang. *massively parallel sequencing* – MPS), zwanego również sekwencjonowaniem głębokim lub nowej generacji (ang. *next-generation sequencing*), pozwoliło na szybkie i jednoczesne namnażanie i sekwencjonowanie wszystkich fragmentów wolnego DNA, w tym płodowego, a następnie ilościowe porównywanie proporcji sekwencji unikatowych dla badanych chromosomów względem sekwencji z innych chromosomów [12].

Porównując sekwencję nukleotydów namnożonego fragmentu DNA z sekwencją referencyjną można określić, z którego chromosomu pochodzi. W przypadku trisomii u płodu liczba otrzymanych w MPS sekwencji, pochodzących z potrójonego chromosomu, wzrasta i zmienia proporcję liczby fragmentów, otrzymywanych dla poszczególnych chromosomów. Proporcję tę wyznaczono dla grupy kontrolnej, jaką stanowią kobiety ze zdrowymi ciążami z uwzględnieniem odchylenia standardowego (*z-score*) [11].

Julia Bijok et al. Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna najczęstszych aneuploidii na podstawie płodowego DNA we krwi matki – doniesienie wstępne.

Cel pracy

Celem pracy było przedstawienie wstępnych wyników nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej najczęstszych aneuploidii (chromosomów 21, 18, 13) przy użyciu płodowego DNA z krwi matki oraz porównanie wyników uzyskanych tą metodą z wynikami klasycznego badania cytogenetycznego.

Materiał i metoda

Badana grupa:

Prezentowane wyniki stanowią wstępne doniesienie na temat skuteczności nowo wdrażanej metody.

Badaną grupę stanowiło 10 ciężarnych z grupy wysokiego ryzyka aneuploidii u płodu, zakwalifikowanych do inwazyjnej diagnostyki prenatalnej na podstawie wyniku nieinwazyjnego badania przesiewowego. Charakterystykę badanej grupy przedstawiono w tabeli I.

Wszystkie pacjentki wyraziły pisemną zgodę na wykonanie badania nieinwazyjnego, badania inwazyjnego, a także na anonimowe wykorzystanie dokumentacji medycznej w celach naukowych. Badanie płodowego DNA było dla pacjentek całkowicie bezpłatne, a jego wynik nie miał wpływu na kwalifikację pacjentki do badania inwazyjnego.

Badanie nieinwazyjne:

Przed wykonaniem badania inwazyjnego pobierano od pacjentki łącznie 10 ml krwi obwodowej do 2 próbek z EDTA i delikatnie mieszano. Materiał przekazywano do Zakładu Immunologii lub Zakładu Histologii Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie w ciągu max. 2 godzin od pobrania próbkę odwirowywano w temperaturze 4 st. C przy przeciążeniu 1600 g, a następnie 2 ml osocza z górnej frakcji ponownie odwirowywano przez 10 min przy przeciążeniu 1600 g, celem usunięcia pozostałych komórek. Tak otrzymane próbki osocza rozdzielano do trzech mikropróbek i zamrażano do temperatury -85°C i w ciągu tygodnia przesyłano 2 z nich w suchym lodzie (aby uniknąć rozmrożenia) do laboratorium BGI Clinical Laboratories (Shenzhen, Chiny), gdzie izolowano płodowe DNA zgodnie z protokołem firmy BGI i przeprowadzano sekwencjonowanie [13]. Zgodnie ze standardami producenta za wysokie ryzyko występowania trisomii 21, 18 lub 13 uznano ryzyko powyżej 1:20.

Badanie inwazyjne:

Wszystkie badania inwazyjne wykonywano pod kontrolą USG drogą przezbrzuszną. Po odkażeniu miejsca wkłucia aspirowano 10–12 ml płynu owodniowego do pustej próbki lub fragment kosmówki do próbki z solą fizjologiczną z heparyną. Materiał przekazywano do Zakładu Genetyki Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie celem oznaczenia kariotypu.

Hodowla komórkowa i barwienie preparatów:

Hodowle komórkowe prowadzono w inkubatorze w temperaturze 37°C i w obecności 5% dwutlenku węgla. Amniocyty hodowano na pożywkach kompletnych AmnioMax (Gibco) i AmnioGrow (Cytogen), natomiast do hodowli komórek trofoblastu stosowano tylko AmnioMax (Gibco). Średnio po 14 dniach do hodowli dodawano kolcemid w stężeniu 10 µg/ml i inkubowano przez 1,5 godziny. Następnie komórki zbierano, wirowano, poddawano szokowi hipotonicznemu w 0,075 M roztworze KCl przez około 30 minut i utrwalano mieszaniną metanolu

i lodowatego kwasu octowego (3:1). Z tak uzyskanej zawiesiny komórkowej wykonywano preparaty na szkiełku mikroskopowym. Przygotowane preparaty trawiono trypsyną, a następnie barwiono odczynnikami Giemzy (tzw. technika GTG). W razie potrzeby chromosomy barwiono również metodą prążkową CBG lub NOR, jak również stosowano technikę FISH. Standardowo analizowano co najmniej 20 płytek metafazowych z przynajmniej dwóch naczyń hodowlanych.

Wyniki

W trzech z dziesięciu próbek badanych klasyczną metodą cytogenetyczną stwierdzono nieprawidłowy kariotyp płodu (w 2 przypadkach – trisomię chromosomu 18, w 1 przypadku – kariotyp mozaikowy). (Tabela II).

Na podstawie płodowego DNA w dziewięciu z dziesięciu badanych próbek osocza za pomocą testu NIFTY udało się określić ryzyko trisomii 21, 18 i 13. W jednej z tych próbek prawidłowo wykazano wysokie ryzyko trisomii chromosomu 18. Nie stwierdzono wyników fałszywie dodatnich.

W pozostałej jednej próbce nie uzyskano jednoznacznego wyniku oceny ryzyka badanych trisomii - podejrzewano wysokie ryzyko trisomii chromosomu 18, ale ilość cfDNA była zbyt mała, aby wynik spełniał standardy producenta testu (wg producenta jest to wskazanie do ponownego pobrania krwi i powtórzenia testu). W badaniu cytogenetycznym potwierdzono trisomię chromosomu 18.

Dyskusja

W odróżnieniu od dotychczas dostępnej diagnostyki nieinwazyjnej, opartej na analizie cech fenotypowych płodu w badaniu USG i profili biochemicznych w surowicy ciężarnej [1], badanie obecnego we krwi matki cfDNA pozwala wykryć zmiany bezpośrednio w genomie płodu [11, 14].

Metody rozróżnienia materiału genetycznego pochodzącego od płodu i od matki wykorzystują różnicę w wielkości fragmentów cfDNA i cfDNA, a także różną metylację DNA i ekspresję kodowanych genów u płodu i u matki [11]. Ze względu na różną częstość występowania poszczególnych nukleotydów na różnych chromosomach, sekwencjonowanie całego genomu z użyciem MPS nie zachodzi jednakowo wydajnie. Tłumaczy to trudności, na jakie napotkano w przygotowywaniu diagnostyki trisomii chromosomów 18 i 13, w których stężenie guaniny i cytozyny jest niższe, niż na chromosomie 21 [15, 16]. Dotychczas udało się jedynie wykalibrować metodę wykrywania aneuploidii chromosomów 21, 18, 13, choć sekwencjonowanie nowej generacji (MPS) teoretycznie umożliwia analizę całego genomu płodu [16, 17].

Pomimo bardzo wysokiej czułości i swoistości w wykrywaniu trisomii 21, 18 i 13 (odpowiednio 100% i 99,9%) żaden z testów wykorzystujących płodowe DNA z osocza matki nie został jeszcze zarejestrowany do celów diagnostycznych [13, 18]. Badanie cfDNA może natomiast służyć jako badanie przesiewowe drugiego rzutu (obejmujące kobiety wysokiego ryzyka aneuploidii u płodu na podstawie standardowych badań przesiewowych) [18]. Zmniejszenie odsetka pacjentek poddawanych diagnostyce inwazyjnej pozwoliłoby zarówno na ograniczenie ryzyka straty ciąży jak i na istotną redukcję kosztów [19].

Obecnie największe korzyści z badania cfDNA mogą odnieść kobiety z fałszywie dodatnim wynikiem badań biochemicz-

Julia Bijok et al. Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna najczęstszych aneuploidii na podstawie płodowego DNA we krwi matki – doniesienie wstępne.

Tabela I. Charakterystyka grupy pacjentek wysokiego ryzyka aberracji chromosomowych u płodu, poddanych badaniu NIFTY (Noninvasive Fetal Trisomy Test).

N	10
Wiek matki (lata)	31 (26-36)
Tydzień ciąży	16 (13-23)
Badanie inwazyjne – Biopsja trofoblastu – Amniopunkcja	n=3 n=7
Wskazania do badania inwazyjnego – NT>95 pc – wada płodu • holoprosencefalia półkątowa • obustronne worki limfatyczne w okolicy szyi • zespół wad – wiek≥35 rż	– n=5 – n=4 • n=1 • n=1 • n=2 – n=1

Tabela II. Nieprawidłowe kariotypy, stwierdzone w badaniu cytogenetycznym w grupie dziesięciu pacjentek wysokiego ryzyka aberracji chromosomowych u płodu, poddanych badaniu NIFTY (Noninvasive Fetal Trisomy Test).

Kariotyp	NIFTY	Wskazanie do badania inwazyjnego	Wynik ciąży
47,XX,+18	brak wyniku – próbka nie spełniała standardów producenta testu NIFTY (podejrzanie wysokiego ryzyka trisomii 18)	NT 3,8 mm	ciąża obumarła
47,XY,+18	wysokie ryzyko trisomii 18	zespół wad u płodu	terminacja ciąży
47,XX,+mar/46,XX.ishder(22)(wcp22+)	niskie ryzyko trisomii 21, 18, 13	NT 2,7 mm	kontynuacja ciąży

nych, które unikną dzięki temu badania inwazyjnego oraz kobiety, które mają przeciwwskazania do takiego badania [20].

Najczęściej obserwowanymi w badaniach prenatalnych aberracjami chromosomowymi są aneuploidie chromosomów 21, 18, 13, które mogą być wykrywane za pomocą komercyjnie dostępnych testów. Należy jednak podkreślić, że nieprawidłowości dotyczące innych chromosomów stanowią ok. 15-20% wszystkich aberracji [21, 22]. Na obecnym etapie są one możliwe do wykrycia jedynie za pomocą konwencjonalnych metod cytogenetycznych w materiale uzyskanym drogą inwazyjną. Nietypowe aberracje chromosomowe związane są często ze zmianami w obrazie USG płodu [21]. Z tego względu nieprawidłowości w obrazie ultrasonograficznym płodu powinny być wskazaniem do diagnostyki inwazyjnej i pełnego oznaczenia kariotypu z pominięciem badania płodowego DNA.

W prezentowanym materiale zaobserwowano stosunkowo wysoki odsetek nieprawidłowych kariotypów, co można tłumaczyć kwalifikacją do badania pacjentek o wysokim ryzyku aneuploidii u płodu. W jednej próbce w badaniu cytogenetycznym stwierdzono kariotyp mozaikowy, w którym jedna linia komórkowa zawierała dodatkowy chromosom markerowy, pochodzący z chromosomu 22 (47,XX,+mar/46,XX.ish der(22)(wcp+)). Wskazaniem do badania było NT=2,7 mm. Rodzice mają prawidłowe kariotypy. W badaniu cfDNA w tej próbce prawidłowo określono ryzyko trisomii chromosomów 21, 18 i 13 jako niskie. Ponieważ stosowany przez nas test ukierunkowany jest na wykrywanie jedynie wyżej wymienionych trisomii, z założenia nie było możliwości stwierdzenia zwiększonego ryzyka kariotypu mozaikowego.

W naszym materiale w jednej próbce ilość płodowego DNA była zbyt mała, aby wynik spełnił standardy producenta. Stężenie cfDNA w surowicy ciężarnej ma zasadniczy wpływ na możliwość wykrycia trisomii u płodu. W badaniu określa się bowiem proporcje fragmentów DNA pochodzących z analizowanego chromosomu w stosunku do fragmentów DNA z innych chromosomów, a uzyskane wyniki przyrównuje się do wartości uzyskanych w próbce referencyjnej. W związku z dużym rozcieńczeniem płodowego DNA w stosunku do wolnego DNA matki, w przypadku trisomii u płodu wzrost ilości fragmentów DNA pochodzących z analizowanego chromosomu, występującego w trzech kopiach, w stosunku do fragmentów DNA pochodzących z innych chromosomów jest mało zauważalny. Różnicę taką tym łatwiej wykryć im odsetek frakcji płodowego DNA w stosunku do całego wolnego DNA jest wyższy [15]. Stwierdzenie takiej różnicy jest niemożliwe, jeżeli frakcja cfDNA stanowi poniżej 4% całkowitego wolnego DNA w osoczu matki [23].

Masa ciała ciężarnej jest czynnikiem najistotniej wpływającym na proporcję cfDNA do całkowitego cfDNA w osoczu [24]. U otyłych pacjentek ilość cfDNA pochodzenia matczynego jest podwyższona, co ma najprawdopodobniej związek z przyspieszonym obiegiem adipocytów, które ulegając degradacji uwalniają fragmenty DNA do osocza matki. Skuteczność badania u takich pacjentek jest niższa ze względu na fakt, że cfDNA stanowi mały odsetek w całej puli wolnego DNA krążącego w krwiobiegu ciężarnej [25].

Ilość cfDNA w osoczu matki wzrasta wraz z trwaniem ciąży [11]. Dzięki temu nieinwazyjną diagnostyką na podstawie analizy płodowego DNA można zaproponować również pacjentkom,

Julia Bijok et al. Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna najczęstszych aneuploidii na podstawie płodowego DNA we krwi matki – doniesienie wstępne.

które zgłoszą się na badanie po 14 t.c., kiedy niemożliwe jest już wykonanie testu PAPPa. W prezentowanym materiale jedna próbka pochodziła od pacjentki w 23 t.c. Z drugiej strony, aby zagwarantować odpowiednie stężenie cfDNA w próbce, badanie powinno się wykonywać po 12 t.c. Stosunkowo długi czas oczekiwania na wynik może spowodować w tej sytuacji wydłużenie procesu diagnostycznego [20].

U kobiet starszych, a także w przypadku występowania u płodu aberracji chromosomowych, większa ilość komórek łożyska ulega apoptozie, co w teorii powinno skutkować wyższą koncentracją płodowego DNA we krwi matki. Tymczasem zależność tę stwierdzono jedynie dla trisomii 21 chromosomu [26]. Nie wykazano istotnie statystycznie wyższego stężenia płodowego DNA u kobiet starszych i w ciążyach dotkniętych trisomią 18 chromosomu [26].

Stężenie markerów biochemicznych w surowicy ciężarnej jest pośrednim odzwierciedleniem masy łożyska [26]. Ponieważ płodowe DNA pochodzi głównie z komórek łożyska ulegających apoptozie większą ilość cfDNA stwierdza się u pacjentek z nieprawidłowymi wynikami testu PAPPa – wysokim PAPPa i β -HCG [26]. Na stężenie cfDNA w surowicy ma również wpływ rasa matki i palenie tytoniu [26].

Stężenie płodowego DNA w stosunku do całkowitego wolnego DNA w próbce spada proporcjonalnie do czasu od pobrania krwi. Bez względu na ilość płodowego DNA nie ulega jednak zmianie. Rozpadowi ulegają natomiast komórki matki, co powoduje wzrost całkowitej ilości wolnego DNA w surowicy, a w rezultacie niższą koncentrację cfDNA. Efektowi temu przeciwdziałają szybkie odwirowanie próbki i używanie probówek stabilizujących komórki matki [27]. Nie zaobserwowano natomiast wpływu temperatury przechowywania na ilość płodowego DNA [28]. Fragmenty DNA pochodzące od matki są dłuższe od płodowych i mogą służyć do oceny jakości próbki dostarczonej do laboratorium [27].

Większość dotychczas prowadzonych badań, wykorzystujących cfDNA w nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej obejmowała tylko pacjentki wysokiego ryzyka trisomii u płodu. Do niedawna uważano, iż w grupie niskiego ryzyka, skuteczność badania będzie niższa w związku z niższym stężeniem płodowego DNA w surowicy. Najnowsze badania wykonywane w grupie kobiet poddanych rutynowym badaniom przesiewowym, wykazały jednak podobną skuteczność metody [29].

Podstawowym ograniczeniem metody jest bardzo wysoki koszt aparatury. Skutkuje to potrzebą wysyłania próbek za granicę i długim czasem oczekiwania na wynik (10 dni – 3 tygodnie) [20]. Kolejnym ograniczeniem jest niemożność jej zastosowania w przypadku obecności dodatkowej puli wolno krążącego DNA we krwi ciężarnej, np. w ciąży mnogiej lub w ciąży pochodzącej z adopcji komórki jajowej oraz u pacjentek po przeszczepie komórek macierzystych lub transfuzjach krwi w wywiadzie. W tych przypadkach zaleca się rutynowe badania przesiewowe.

Analizę płodowego DNA proponuje się obecnie głównie pacjentkom wysokiego ryzyka, czyli poddanym uprzednio badaniu USG i badaniom biochemicznym. Oczywiście konsekwencją rozpowszechnienia badania cfDNA również wśród pacjentek niskiego ryzyka będzie w przyszłości ograniczenie zastosowania testu PAPP-A w diagnostyce najczęstszych aneuploidii. Markery biochemiczne odgrywają jednak istotną rolę w skryningu poważnych stanów związanych z patologią łożyska (preeklampsja,

hipotrofia płodu), co wskazuje na nowy kierunek diagnostyki biochemicznej [30].

W związku z udoskonaleniem techniki ultrasonograficznej, które stworzyło możliwość wczesnej identyfikacji wad anatomicznych płodu, badanie USG I-go trymestru nie ogranicza się obecnie jedynie do wykrywania markerów aneuploidii. Zatem mimo rozpowszechnienia badania płodowego DNA, badanie USG pozostanie podstawowym narzędziem diagnostyki prenatalnej [20].

Wnioski

Obecne we krwi matki płodowe DNA może być wykorzystane w nieinwazyjnej diagnostyce najczęstszych trisomii u płodu. Metoda ma wysoką czułość i swoistość, jednak ze względu na mały odsetek wyników fałszywie dodatnich na razie nie może być stosowana w celach diagnostycznych. Wysoki koszt stanowi najpoważniejsze ograniczenie jej szerokiego zastosowania.

Obecnie badanie zalecane jest głównie w grupie pacjentek wysokiego ryzyka aneuploidii u płodu oraz u pacjentek z przeciwwskazaniem do badania inwazyjnego, jednak w przyszłości będzie prawdopodobnie dostępne dla wszystkich kobiet poddawanych rutynowej diagnostyce prenatalnej.

Podziękowania

Autorzy pracy dziękują dr Tomaszowi Stoklosie (Zakład Immunologii, Centrum Biostruktury, Warszawski Uniwersytet Medyczny) oraz dr Pawłowi Włodarskiemu (Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury, Warszawski Uniwersytet Medyczny) za pomoc techniczną przy przygotowaniu osocza do badania płodowego DNA oraz firmie BGI Clinical Laboratories (Shenzhen, Chiny) za bezpłatne przeprowadzenie testów.

Oświadczenie autorów

1. Julia Bijok – analiza wyników, interpretacja uzyskanych wyników, przegląd literatury, przygotowanie manuskryptu, odpowiedź na uwagi recenzentów - autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Katarzyna Gorzelnik – zebranie danych, przegląd literatury, koordynacja badania.
3. Diana Massalska – przegląd literatury, przygotowanie manuskryptu.
4. Alicja Ilnicka – badanie genetyczne.
5. Barbara Pawłowska – badanie genetyczne.
6. Janusz G. Zimowski – badanie genetyczne.
7. Anna Kucińska-Chahwan – pozyskanie uczestników badania i materiału do badania genetycznego.
8. Grzegorz Jakiel – konsultacja gotowego manuskryptu.
9. Tomasz Roszkowski – opracowanie koncepcji pracy, pozyskanie uczestników badania i materiału do badania genetycznego, interpretacja uzyskanych wyników, koordynacja badania.

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. Ghaffari SR, Tahmasebpour AR, Jamal A, [et al.]. First-trimester screening for chromosomal abnormalities by integrated application of nuchal translucency, nasal bone, tricuspid regurgitation and ductus venosus flow combined with maternal serum free -hCG and PAPP-A: a 5-year prospective study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012, 39 (5), 528-534.

Julia Bijok et al. Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna najczęstszych aneuploidii na podstawie płodowego DNA we krwi matki – doniesienie wstępne.

KOMUNIKAT

2. Kagan KO, Wright D, Baker A, [et al.]. Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008, 31 (6), 618-624.
3. Nicolaidis KH, Spencer K, Avgidou K, [et al.]. Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2005, 25 (3), 221-226.
4. Nicolaidis KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn.* 2011, 31 (1), 7-15.
5. Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther.* 2010, 27 (1), 1-7.
6. Tabor A, Vestergaard CH, Lidegaard Ø. Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009, 34 (1), 19-24.
7. Walkowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet.* 1969, 1 (7606), 1119-1122.
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. Lo YM, Tein MS, Lau TK, [et al.]. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998, 62 (4), 768-775.
10. Zhu YJ, Zheng YR, Li L, [et al.]. Diagnostic accuracy of non-invasive fetal RhD genotyping using cell-free fetal DNA: a meta analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014, Feb 10.
11. Lo YM, Chiu RW. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis. *Clin Chem.* 2008, 54 (3), 461-466.
12. Moorhies S, Mattocks CJ, Wright CF. Review of massively parallel DNA sequencing technologies. *Hugo J.* 2011, 5(1-4), 1-12.
13. 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, 5 (1), 57.
14. Gorzelnik K, Bijok J, Zimowski J, [et al.]. Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna trisomii 21, 18 i 13 z wykorzystaniem wolnego pozakomórkowego DNA płodu. *Ginekol Pol.* 2013, 84 (08), 714-719.
15. Chiu RWK, Chan KCA, 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 U S A.* 2008, 105 (51), 20458-20463.
16. Liang D, Lv W, Wang H, [et al.]. Non-invasive prenatal testing of fetal whole chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing. *Prenat Diagn.* 2013, 33 (5), 409-415.
17. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, [et al.]. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ.* 2011, 342, c7401.
18. Devers PL, Cronister A, Ormond KE, [et al.]. Noninvasive prenatal testing/noninvasive prenatal diagnosis: the position of the national society of genetic counselors. *J Genet Couns.* 2013, 22 (3), 291-295.
19. Garfield SS, Armstrong SO. Clinical and cost consequences of incorporating a novel non-invasive prenatal test into the diagnostic pathway for fetal trisomies. *J Managed Care Med.* 2012, 15, 34-41.
20. Hui L. Non-invasive prenatal testing for fetal aneuploidy: charting the course from clinical validity to clinical utility. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013, 41 (1), 2-6.
21. Silver RK, Blum K, Geibel LJ, [et al.]. Clinical implications of atypical chromosome abnormalities diagnosed prenatally. *Obstet Gynecol.* 1999, 94 (6), 925-928.
22. Bijok J, Szyszka M, Michałowska A, [et al.]. Analiza biopsji trofoblastu przeprowadzonych w I Klinice Ginekologii i Położnictwa – CMKP SPSK im. Prof. Orłowskiego w Warszawie – doniesienie wstępne. *Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia.* 2010, 3 (2), 145-152.
23. 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.
24. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, [et al.]. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013, 41 (1), 26-32.
25. Haghiac M, Vora NL, Basu S, [et al.]. Increased death of adipose cells, a path to release cell-free DNA into systemic circulation of obese women. *Obesity (Silver Spring).* 2012, 20 (11), 2213-2219.
26. Ashoor G, Poon L, Syngelaki A, [et al.]. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: effect of maternal and fetal factors. *Fetal Diagn Ther.* 2012, 31 (4), 237-243.
27. Barrett AN, Zimmermann BG, Wang D, [et al.]. Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: accurate identification of factors affecting fetal DNA yield. *PLoS One.* 2011, 6 (10), e25202.
28. Hidestrand M, Stokowski R, Song K, [et al.]. Influence of temperature during transportation on cell-free DNA analysis. *Fetal Diagn Ther.* 2012, 31 (2), 122-128.
29. Nicolaidis KH, Syngelaki A, Ashoor G, [et al.]. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol.* 2012, 207 (5), 374.e1-6.
30. Akolekar R, Syngelaki A, Poon L, [et al.]. Competing risks model in early screening for preeclampsia by biophysical and biochemical markers. *Fetal Diagn Ther.* 2013, 33 (1), 8-15.

Sekcja Ultrasonografii Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego

Stowarzyszenie na Rzecz Zdrowia Matki i Dziecka



Zapraszają na NOWY CYKL kursów i zajęć praktycznych (warsztaty)

w zakresie

diagnostyki ultrasonograficznej w położnictwie i ginekologii

Luty 2014 Poznań

- 20.02.2014 Warsztaty praktyczne
- 21.02.2014 Kurs do Certyfikatu Badań Dopplerowskich Sekcji USG PTG
- 22.02.2014 Kurs do Certyfikatu Podstawowego Sekcji USG PTG

Kwiecień 2014 Poznań

- 03.04.2014 Warsztaty praktyczne
- 04.04.2014 Kurs do Certyfikatu oceny serca płodu Sekcji USG PTG
- 05.04.2014 Kurs do Certyfikatu Badań Prenatalnych Sekcji USG PTG

Czerwiec 2014 Nowy Targ/Zakopane

- 05.06.2014 Warsztaty praktyczne - Nowy Targ
- 06-07.06.2014 IV Praktyczna Ultrasonografia w Ginekologii i Położnictwie - Zakopane

Wrzesień 2014 Poznań

- 11.09.2014 Warsztaty praktyczne
- 12.09.2014 Kurs do Certyfikatu Podstawowego Sekcji USG PTG

Listopad 2014 Poznań

- 27.11.2014 Warsztaty praktyczne
- 28.11.2014 Diagnostyka Ultrasonograficzna w niepłodności, onkologii ginekologicznej i uroginekologii (kurs do Certyfikatu Podstawowego Sekcji USG PTG)
- 29.11.2014 Kurs do Certyfikatu Badań Dopplerowskich Sekcji USG PTG

Programy szczegółowe kursów dostępne na stronie internetowej:

www.usgptg.plKursy premiowane są 30 pkt akredytacyjnymi
Sekcji USG PTG.

Zgłoszenia listownie, faksem lub e-mailem:
Klinika Położnictwa i Chorób Kobiectw UM w Poznaniu
60-535 Poznań, ul. Polna 33
fax. (61) 8419-647,
tel. (61) 8419-334, 8419-441

e-mail: kpichk@gpsk.am.poznan.plProszę przy zgłoszeniu podać nr NIP oraz dane do faktury
Nie pośredniczymy w rezerwacji hoteli.