

Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna trisomii 21, 18 i 13 z wykorzystaniem wolnego pozakomórkowego DNA płodu

Noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21, 18 and 13 using cell – free fetal DNA

Katarzyna Gorzelnik¹, Julia Bijok¹, Janusz G. Zimowski², Grzegorz Jakiel¹, Tomasz Roszkowski¹

¹ I Klinika Ginekologii i Położnictwa – CMKP SPSK im. prof. Orłowskiego, Warszawa, Polska

² Zakład Genetyki, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa, Polska

Streszczenie

Trisomie chromosomów 21, 18 i 13 należą do najczęściej diagnozowanych aberracji chromosomowych u noworodków. Obecnie w celu oceny ryzyka ich wystąpienia wykonuje się badanie ultrasonograficzne oraz testy biochemiczne. Stwierdzenie na podstawie testów przesiewowych wysokiego ryzyka trisomii u płodu jest wskazaniem do oznaczenia kariotypu klasyczną metodą cytogenetyczną, która niesie za sobą potrzebę pobrania materiału genetycznego płodu. Badania inwazyjne (amniopunkcja, biopsja trofoblastu) obarczone są ryzykiem straty ciąży. Wykrycie obecności wolnego pozakomórkowego DNA płodu (cffDNA – cell free fetal DNA) we krwi matki zapoczątkowało szereg badań nad możliwościami jego wykorzystania w diagnostyce prenatalnej. cffDNA stanowi jednak tylko niewielką część całkowitej puli wolnego DNA we krwi matki, dlatego jego analiza jest trudna.

Wprowadzenie metody masywnego równoległego sekwencjonowania umożliwiło zastosowanie nieinwazyjnych testów w praktyce klinicznej, a prowadzone w ostatnich latach liczne badania dowiodły skuteczności metody w diagnostyce prenatalnej trzech najczęściej występujących trisomii.

Słowa kluczowe: **nieinwazyjna diagnostyka prenatalna / płodowe DNA /
/ aberracje chromosomowe / sekwencjonowanie DNA /**

Abstract

Trisomy 21, 18 and 13 are the most common trisomies diagnosed in newborns. Screening methods consist of ultrasound and maternal serum markers. High risk for fetal aneuploidies is an indication for routine karyotyping, which requires collection of fetal tissue through amniocentesis or chorionic villous sampling. They are invasive procedures and carry a potential risk of miscarriage. The discovery of cell free fetal DNA (cffDNA) in maternal blood offered new opportunities for noninvasive prenatal diagnosis.

Adres do korespondencji:

Katarzyna Gorzelnik

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

ul. Czerniakowska 231, 00-416 Warszawa, Polska

e-mail: gorzelnik.katarzyna@gmail.com

Otrzymano: 22.02.2012

Zaakceptowano do druku: 10.06.2013

Katarzyna Gorzelnik et al. Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna trisomii 21, 18 i 13 z wykorzystaniem wolnego pozakomórkowego DNA płodu.

The fraction of cell-free fetal DNA in total pool of cell-free DNA in maternal plasma is very low, therefore the analysis of cffDNA is very challenging. The introduction of massive parallel sequencing has enabled the application of noninvasive prenatal testing in the clinical practice and a variety of recent studies have proven its high efficacy in diagnosing common aneuploidies.

**Key words: noninvasive prenatal diagnosis / cffDNA / chromosomal aneuploidies /
/ maternal blood / massively parallel sequencing /**

Wstęp

Trisomie chromosomów 21, 18 i 13 to najczęściej stwierdzane aberracje chromosomowe u noworodków. Ich obecność wiąże się ze zwiększonym ryzykiem obumarcia wewnątrzmacicznego płodu lub zgonu wkrótce po urodzeniu, a także wadami anatomicznymi, niepełnosprawnością intelektualną oraz zaburzeniami w dalszym rozwoju dziecka [1]. Pomimo stałego rozwoju diagnostyki prenatalnej, wykrywanie tych aneuploidii, szczególnie we wczesnym okresie ciąży, stanowi wciąż poważne wyzwanie dla współczesnego położnictwa.

Częstość występowania aneuploidii chromosomów autosomalnych u płodu wzrasta wraz z wiekiem matki. Dla kobiety 20-letniej ryzyko wystąpienia trisomii chromosomów 21, 18 i 13 w 12 tygodniu ciąży wynosi odpowiednio 1:1000, 1:2500 oraz 1:8000, podczas gdy dla pacjentki 35-letniej ryzyko to wynosi już odpowiednio więcej – 1:250, 1:600 i 1:1800 [2].

Głównym narzędziem używanym w celu oceny ryzyka wystąpienia aberracji chromosomowych u płodu jest wykonywane w I trymestrze ciąży badanie ultrasonograficzne wspomaganie przez wykonanie testów biochemicznych (tzw. testu PAPP-A), tj. ocenę wolnej podjednostki β -HCG i związanego z ciążą białka A (ang. pregnancy associated plasma protein – A (PAPP-A)) we krwi matki [3]. Oba te badania spełniają rolę badań przesiewowych – są wykonywane w ciążach potencjalnie zdrowych w celu wykrycia ewentualnych patologii. Na ich podstawie ocenia się u każdej pacjentki tzw. indywidualne ryzyko aberracji chromosomowych u płodu. Czulość badania USG wykonywanego pomiędzy 11 a 13⁶ tygodniem ciąży w wykrywaniu trisomii 21 jedynie na podstawie wieku matki i przezierności karku płodu (ang. *nuchal translucency* – NT) wynosi około 75%. Wykonanie testu PAPP-A zwiększa czulość badania do około 85-90%, a wyniki fałszywie dodatnie stanowią 5%. Dodatkowa ocena obecności kości nosowej, przepływu krwi przez przewód żylny lub przepływu przez zastawkę trójdzielną podnosi czulość badania do 93-96%, przy odsetku wyników fałszywie dodatnich wynoszącym 2,5% [4].

W przypadku stwierdzenia na podstawie testów przesiewowych I trymestru zwiększonego ryzyka wystąpienia aberracji chromosomowych u płodu (w Polsce $\geq 1/300$) pacjentka powinna zostać skierowana na badanie inwazyjne, czyli, w zależności od wieku ciążowego, na biopsję trofoblastu lub amniopunkcję [5]. W przeciwieństwie do USG i testu PAPP-A, badania inwazyjne niosą za sobą ryzyko powikłań, w szczególności ryzyko poronienia, oceniane w literaturze na poziomie około 0,5-1% [6, 7].

Jedynie badanie cytogenetyczne materiału pobranego w trakcie badania inwazyjnego daje ostateczną odpowiedź co do kariotypu dziecka, a jego czulość i swoistość a jest najwyższa i sięga 100%.

Ryzyko badania inwazyjnego podejmowane jest jednak bardzo często niepotrzebnie, głównie na podstawie fałszywie dodatniego wyniku testu przesiewowego. W Wielkiej Brytanii, gdzie do badania inwazyjnego kwalifikowane są pacjentki, u których ryzyko wystąpienia trisomii u płodu oceniane jest na $>1:150$, oczekiwany odsetek chorych płodów wynosi około 9% [8]. Oznacza to, że 91% pacjentek, poddanych badaniu inwazyjnemu, otrzyma wynik prawidłowy, chociaż były narażone na powikłania, a państwowy system ochrony zdrowia – na niepotrzebne koszty. Dlatego też wciąż toczy się dyskusja nad właściwą kwalifikacją pacjentek do badań inwazyjnych. Poszukuje się także lepszych metod diagnostycznych i przesiewowych, które byłyby obciążone jak najmniejszym ryzykiem dla matki i płodu, a przy tym charakteryzowały się wysoką czulością i swoistością.

Komórki płodu we krwi matki

W każdej fizjologicznej ciąży niewielka ilość komórek płodu dostaje się do krwioobiegu matki [9]. Wyodrębnienie płodowych komórek z krwi matki pozwala na bezpośrednią analizę chromosomów oraz DNA płodu [10]. W ostatnich latach podejmowano szereg prób wykorzystania tego zjawiska w diagnostyce prenatalnej.

Wśród komórek pochodzenia płodowego, które mogłyby zostać wykorzystane w nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej wymieniano m. in. komórki trofoblastu, leukocyty, niektóre komórki macierzyste układu hematopoetycznego oraz jądrzaste erytrocyty płodowe. Najwięcej nadziei wiązano z badaniem erytrocytów płodu, gdyż w przeciwieństwie do innych komórek, na przykład leukocytów, znikają one z krwioobiegu matki wkrótce po porodzie [11, 12, 13].

Dodatkowo zauważono, że we krwi kobiet, których płody miały stwierdzoną aneuploidię, znajduje się większa ilość komórek płodowych. W przypadku płodów z trisomią 21 wzrost ten jest nawet 6-krotny [14].

Pomimo bardzo obiecujących wstępnych doniesień [10], badanie komórek płodu nie znalazło do tej pory klinicznego zastosowania. Głównym ograniczeniem tej metody jest bardzo mała ilość komórek płodu obecnych we krwi matki, trudność z odrozdzeniem ich od komórek macicznych oraz stosunkowo długi okres przetrwania w organizmie matki [15].

Katarzyna Gorzelnik et al. Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna trisomii 21, 18 i 13 z wykorzystaniem wolnego pozakomórkowego DNA płodu.

DNA płodu we krwi matki

Wielkim przełomem w nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej było odkrycie w 1997 roku obecności wolnego pozakomórkowego DNA płodu (ang. *cell-free fetal DNA* – cffDNA) we krwi matki [16]. Fragmenty płodowego DNA są uwalniane do krążenia matki w postaci mikromolekuł, które chronią DNA przed znajdującymi się w osoczu matki nukleazami [17]. cffDNA pochodzi głównie z łożyska, chociaż niewielka jego ilość może również uwalniać się w czasie apoptozy elementów komórkowych pochodzenia płodowego oraz bezpośrednio z płynu owodniowego [18]. Stanowi ono ok. 10% całkowitej puli wolnego DNA (ang. *cell-free DNA* – cfDNA) we krwi matki [19]. Jego ilość rośnie wraz z wiekiem ciążowym i może być wykrywane już od 7 tygodnia ciąży [20]. Ponadto ilość znajdującego się w osoczu matki wolnego płodowego DNA jest zdecydowanie większa, niż DNA obecnego w erytrocytach jądrzastych płodu.

Czas połowicznego rozpadu cffDNA wynosi około 16 min (4-30 min), dzięki czemu znika ono z krwioobiegu matki bezpośrednio po porodzie i jest swoiste dla danej ciąży [21, 22]. Z tego powodu liczne kontrowersje wzbudziło wykazanie przez niektórych autorów obecności DNA płodu we krwi matki jeszcze kilka lat po zakończeniu ciąży [23]. Dokładna analiza ich wyników wykazała jednak, że najprawdopodobniej było to następstwem zastosowania nieprawidłowej techniki pozyskiwania DNA, którego źródłem były płodowe elementy komórkowe, na przykład wspomniane już leukocyty. Nie było to zatem wolne pozakomórkowe DNA [18, 24]. Czas półtrwania cffDNA może być natomiast rzeczywiście wydłużony w niektórych stanach chorobowych matki. Taka sytuacja ma miejsce na przykład w stanie przedrzucawkowym, gdzie okres jego połowicznego rozpadu wynosi 114 min [25, 26].

Możliwości diagnostyczne w oparciu o płodowe DNA we krwi matki

Pierwsze próby zastosowania cffDNA w praktyce dotyczyły wykrywania chorób genetycznych sprzężonych z płcią, gdyż stwierdzenie sekwencji DNA charakterystycznej dla chromosomu Y dawało pewność, że badany materiał pochodzi od płodu. Ten sam mechanizm wykorzystano w celu określenia czynnika Rh płodu u ciężarnych RH-ujemnych. Badania te są już wykonywane w niektórych ośrodkach [27, 28, 29].

Ilość płodowego DNA wzrasta we krwi ciężarnych, zagrożonych wystąpieniem stanu przedrzucawkowego i porodu przedwczesnego, co wskazuje również na inne możliwe zastosowania płodowego cffDNA w praktyce klinicznej [30, 31]. Analiza cffDNA z krwi matki pozwala także w niektórych przypadkach na stwierdzenie choroby monogenowej [32, 33].

Diagnostyka aneuploidii na podstawie cffDNA we krwi matki okazała się trudniejsza, ponieważ sekwencje z chromosomu, pochodzącego od płodu, nie różnią się od sekwencji matczynych. W przypadku trisomii u płodu, u ciężarnej wzrasta jednak proporcja fragmentów DNA, pochodzących z chromosomu obecnego u płodu w potrójnej ilości, w stosunku do całkowitej puli wolnego DNA we krwi matki [17]. Wyodrębnienie sekwencji DNA charakterystycznych dla szukanego chromosomu, ich namnożenie, a następnie precyzyjna ocena ilościowa pozwoliłyby na wykrycie u płodu aneuploidii.

Metody

Początkowo analiza DNA płodu obecnego w krwi matki oparta była na technice PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) i ukierunkowana na wykrywanie sekwencji nieobecnych w genomie matki, np. mutacji obecnej w genomie ojca lub nowopowstałej mutacji [34,35].

Aby wykazać obecność trisomii należy odnaleźć sekwencję charakterystyczną dla danego chromosomu (np. chromosomu 21) i poddać ją ocenie ilościowej. W tym celu podjęto próby zastosowania techniki digital-PCR [36,37]. Jednak ze względu na to, że pozakomórkowe DNA ma postać tylko krótkich fragmentów (odcinki zbudowane z maksymalnie 300 nukleotydów), wybranie locus możliwego do amplifikacji i dodatkowo z różnymi allelami matki i płodu (jeden z nich jest oczywiście wspólny) jest szczególnie trudne. Ponadto chcąc wykazać obecność trisomii nie wystarczy jedynie odnaleźć daną sekwencję, ale należy również ocenić jej dokładną ilość, co wobec jedynie niewielkiego udziału płodowego DNA w cfDNA krążącym we krwi ciężarnej nie zawsze jest precyzyjne.

Przełomem w nieinwazyjnej diagnostyce aneuploidii stało się wprowadzenie tzw. masywnego równoległego sekwencjonowania (ang. *massively parallel sequencing* – MPS), nazywanego również sekwencjonowaniem nowej generacji (ang. *next generation sequencing* – NGS). Metoda ta pozwala na równoczesne namnożenie i sekwencjonowanie całego materiału genetycznego. Badany jest nie tylko jeden znany gen znajdujący się w określonym *locus*, ale ustalana jest cała sekwencja badanego DNA. Wynik MPS stanowią setki milionów kilkudziesięciounukleotydowych odcinków DNA, które są przyporządkowywane do poszczególnych chromosomów, a następnie zliczane. Ilość otrzymanych fragmentów, odpowiadających chromosomowi 21, jest większa, gdy matrycowe DNA zawiera domieszkę z dodatkowym chromosomem 21 [38, 39]. Z tego powodu wykrycie zwiększenia, w przypadku trisomii, ilości namnożonych sekwencji, pochodzących z danego chromosomu, wymaga dokładnego określenia zakresu wartości referencyjnych [40].

Początkowo uwaga badaczy była skupiona głównie na wykrywaniu trisomii 21 i dość szybko wykazano, że można tego dokonać z czułością i swoistością nie ustępującą znacznie tradycyjnemu badaniu cytogenetycznemu. Wkrótce udało się w ten sam sposób wykryć także obecność trisomii chromosomu 18 i 13 [41, 42]. Ze względu na to, że metoda MPS umożliwia sekwencjonowanie całego genomu, potencjalnie możliwe jest wykrycie aberracji dotyczących także innych chromosomów [43].

Nieinwazyjna diagnostyka aneuploidii – przegląd piśmiennictwa

W 2012 roku Verweij i wsp. dokonali przeglądu systematycznego przeprowadzonych w latach 1997 – 2011 badań dotyczących skuteczności nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej trisomii 21 na podstawie analizy materiału genetycznego płodu z krwi matki (DNA lub mRNA). W sumie, na podstawie dwóch badań spełniających wysokie kryteria jakościowe, obejmujących 681 ciężarnych, stwierdzono, że zastosowanie metody MPS i odpowiednia analiza bioinformatyczna zgromadzonych danych pozwala na wykazanie obecności u płodu trisomii 21 z blisko 100% czułością (95% CI 97,5-100%) i 99 % swoistością (95% CI 98,7-99,3%) [44].

Katarzyna Gorzelnik et al. Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna trisomii 21, 18 i 13 z wykorzystaniem wolnego pozakomórkowego DNA płodu.

Nieco trudniejsza okazała się diagnostyka trisomii chromosomów 18 i 13. Było to spowodowane mniejszą częstością występowania tych trisomii, a także nieco rzadszą, w porównaniu do chromosomu 21, obecnością na tych chromosomach cytozyny i guaniny, co miało wpływ na wydajność sekwencjonowania [43]. Zastosowanie odpowiednich algorytmów matematycznych, uwzględniających te różnice, pozwoliło jednak na uzyskanie zachęcających wyników również w diagnostyce zespołów Edwardsa i Patau [41, 42].

W jednym z najnowszych wielośrodkowych badań przeprowadzonych przez Dan i wsp. pobierano próbki krwi od 11,105 ciężarnych między 9 a 28 tygodniem ciąży, zakwalifikowanych do badania inwazyjnego na podstawie dotychczas uznanych kryteriów. Przy użyciu techniki MPS właściwie zdiagnozowano 143 przypadki trisomii 21 i 47 przypadków trisomii 18 u płodu. Stwierdzono 1 wynik fałszywie dodatni dla trisomii 21 i jeden wynik fałszywie dodatni dla trisomii 18 oraz brak wyników fałszywie ujemnych, co wskazywało na 100% czułość i 99,96% swoistość badania. Autorzy pracy podkreślają jednak, że tylko u 371 kobiet wiek ciąży był pomiędzy 9 a 12 tygodniem, dlatego w tej grupie pacjentek wymagane są dalsze badania [45].

W innym badaniu wykonanym przez Chen i wsp. wzięły udział 392 ciężarne. Przy pomocy techniki MPS prawidłowo zdiagnozowano wszystkie przypadki trisomii 13 (25 przypadków) (czułość 100%, swoistość 98,9%) i 34 z 37 przypadków trisomii 18 (czułość 91,9% i swoistość 98%) [42]. Podobne wyniki uzyskali także inni autorzy [46,47,48].

Większość badań, wykorzystujących cfDNA we krwi matki w diagnostyce najczęstszych trisomii u płodu, prowadzona była na próbkach krwi pochodzących od pacjentek z grupy zwiększonego ryzyka wystąpienia aneuploidii, które zostały zakwalifikowane do badania inwazyjnego. Dodatkowo wyniki badania cfDNA każdorazowo porównywano z wynikami badania tkanek płodu, otrzymanych w czasie badania inwazyjnego. Z tego względu badanie cfDNA zalecane jest obecnie jedynie pacjentkom z grupy wysokiego ryzyka.

Najnowsze badanie Nicolaides i wsp., przeprowadzone w grupie pacjentek rutynowo poddawanych przesiewowej diagnostyce prenatalnej, wykazało skuteczność wykrywania trisomii chromosomu 21 i 18 na podstawie cfDNA, porównywalną z wynikami uzyskanymi u pacjentek wysokiego ryzyka aneuploidii u płodu [49]. Podobne wyniki uzyskali także inni badacze [50].

Zalety i ograniczenia badania płodowego DNA w nieinwazyjnej diagnostyce aneuploidii

Największą zaletą badania płodowego DNA z krwi matki jest jego nieinwazyjność oraz bardzo wysoka czułość i swoistość, nieznacznie tylko ustępująca rutynowemu oznaczeniu kariotypu z materiału pobranego drogą inwazyjną.

Podstawowym ograniczeniem badania płodowego DNA z krwi matki jest wysoki koszt, który podyktowany jest potrzebą zapewnienia specjalistycznego sprzętu i wykwalifikowanego zespołu [51]. Dotychczasowa niewielka dostępność testów oraz brak wyraźnej konkurencji na rynku dodatkowo zwiększają koszty. Wraz z rozpowszechnieniem się badania jego koszt powinien jednak w niedalekiej przyszłości wyraźnie zmaleć.

Zastosowanie badania cfDNA jako testu przesiewowego pozwoliłoby znacznie zredukować liczbę kobiet niepotrzebnie

poddawanych procedurom inwazyjnym, według niektórych autorów nawet o 75% [52]. Niesie to za sobą korzyści zarówno medyczne jak i ekonomiczne. Obecnie dostępne testy przesiewowe, oparte na markerach ultrasonograficznych i biochemicznych, charakteryzują się stosunkowo wysoką czułością (ponad 90%). Przy aktualnych cenach badania cfDNA koszt wykrycia trisomii 21, której nie wykryłoby stosując obecny algorytm diagnostyczny, jest jednak bardzo wysoki i prawdopodobnie zbyt obciążający dla większości systemów opieki zdrowotnej [53]. W Polsce badania przesiewowe wykonywane są głównie prywatnie i mało prawdopodobna jest refundacja badania cfDNA przez Narodowy Fundusz Zdrowia. Zagadnienia ekonomiczne dotyczą zatem głównie kosztów, jakie pacjentka jest skłonna ponieść indywidualnie.

Grupę, która może odnieść największą korzyść z zastosowania badania cfDNA stanowią pacjentki, u których badanie USG jest całkowicie prawidłowe, ale mają nieprawidłowe wyniki testu biochemicznego (PAPP-A, β -HCG), bądź wymagają diagnostyki ze względu na wiek lub lęk przed urodzeniem chorego dziecka [51]. Badanie cfDNA może być także zaoferowane pacjentkom, które mają przeciwwskazania do badania inwazyjnego. Są to kobiety, u których wykonanie amniopunkcji lub biopsji trofoblastu wiąże się ze zdecydowaniem większym ryzykiem straty ciąży, np. pacjentki z krwawieniem z dróg rodnych.

Niewątpliwą zaletą tego badania jest brak wyraźnych ram czasowych, kiedy może być ono wykonane. W związku z tym, u pacjentek, zgłaszających się po 14 tygodniu ciąży, u których nie ma już możliwości określenia ryzyka trisomii na podstawie USG i testu PAPP-A, wciąż można wykonać badanie cfDNA z krwi matki.

Pobranie krwi od pacjentki, w przeciwieństwie do oceny markerów aneuploidii w badaniu USG, może być wykonane bez udziału lekarza. Ocena przezierności karku i obecności kości nosowej wymaga odpowiednich kwalifikacji i aparatu USG o wysokiej rozdzielczości, co nie zawsze ma miejsce w praktyce i zwiększa wpływ błędu ludzkiego na kwalifikację pacjentek do badania inwazyjnego.

Należy jednak pamiętać, że istotnym problemem jest długi czas oczekiwania na wynik. Chociaż wynik badania cfDNA z krwi matki można uzyskać już po kilku dniach [45], to ze względu na brak możliwości wykonania go w Polsce, czas ten może wydłużyć się nawet do 2-3 tygodni. Wynik standardowego badania cytogenetycznego w polskich warunkach otrzymuje się po około 3 tygodniach. Oznacza to dla pacjentek, które wymagają potwierdzenia wyniku metodami klasycznymi, wydłużenie czasu oczekiwania na ostateczny wynik nawet do 6 tygodni. W przypadku wykonywania badania cfDNA w 12 tygodniu ciąży wynik kariotypu zostanie zatem wydany dopiero ok. 18 tygodnia ciąży.

Ogromny postęp technologiczny w zakresie ultrasonografii prenatalnej zmienił spektrum wskazań do diagnostyki inwazyjnej. Obecnie głównym wskazaniem do oznaczania kariotypu u płodu jest stwierdzenie nieprawidłowości w badaniu USG I trymestru, w szczególności zwiększonej przezierności karku płodu, a ryzyko nieprawidłowego kariotypu w tych przypadkach wynosi ok. 30% [54, 55]. Jednocześnie w tej grupie pacjentek stwierdzana jest zdecydowana większość wszystkich wykrywanych nieprawidłowych kariotypów. Dlatego pacjentki, u których stwierdza się nieprawidłowości w badaniu USG powinny być

Katarzyna Gorzelnik et al. Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna trisomii 21, 18 i 13 z wykorzystaniem wolnego pozakomórkowego DNA płodu.

kierowane bezpośrednio na badanie inwazyjne.

Należy pamiętać, że obecnie oferowane na rynku testy wykrywają tylko trzy najczęściej występujące trisomie u płodu (chromosomów 21, 18 i 13). Nieprawidłowości dotyczące innych chromosomów stanowią około 20% wszystkich aberracji wykrywanych prenatalnie [55,56]. Powszechnie stosowane algorytmy badań przesiewowych są również ukierunkowane na wykrywanie tylko najczęstszych aneuploidii, jednak zarówno markery ultrasonograficzne, jak i biochemiczne mogą być pomocne w diagnostyce także innych nieprawidłowości genetycznych. Klasyczne badanie cytogenetyczne pozwala na dużo bardziej wnikliwą analizę, w tym m.in. wykrywanie translokacji, delecji, mozaicyzmu oraz poliploidii, które również mają znaczenie w patologii płodu.

Ostateczna diagnoza czy tylko badanie przesiewowe?

Jakie jest wobec tego miejsce sekwencjonowania płodowego DNA z krwi matki w obecnej diagnostyce prenatalnej? Od 2011 roku testy wykrywające obecność trisomii chromosomów 21, 18 i 13 płodu na podstawie analizy DNA z krwi matki są dostępne komercyjnie w USA, a od 2012 roku także w Niemczech, Szwajcarii, Austrii i Lichtensteinie. W krajach niemieckojęzycznych badanie w kierunku trisomii 21 chromosomu jest możliwe do wykonania pomiędzy 12 a 33 tygodniem ciąży [57]. Badanie to jest również wykonywane w Chinach. Cena w USA waha się od 795 – 2762 dolarów, w Niemczech wynosi ona 1250 euro, a w Chinach 500-1000 dolarów [45, 57]. Nigdzie nie podlega ono refundacji. Obecnie badanie cfDNA zalecane jest jedynie w skriningu i nie jest zarejestrowane do celów diagnostycznych [58, 59]. Producenci testów zastrzegają, że stwierdzenie na ich podstawie wysokiego ryzyka wystąpienia trisomii każdorazowo wymaga potwierdzenia wyniku przez wykonanie badania inwazyjnego.

Należy pamiętać, że testy wykorzystujące cfDNA obecne są na rynku od niedawna. Brakuje więc informacji zwrotnej na temat ich rzeczywistej przydatności w praktyce klinicznej [44, 51]. Odstąpienie od wykonania badania inwazyjnego u pacjentek z wysokim ryzykiem określonym na podstawie dotychczas stosowanych i sprawdzonych metod, ale z ujemnym wynikiem badania płodowego DNA z krwi matki, może budzić szereg wątpliwości. Na pewno jednak wraz z upowszechnieniem się metody, możliwa będzie weryfikacja dotychczasowych wyników badań na większej grupie pacjentek.

Zgodnie z obecnie panującym poglądem badanie płodowego DNA z krwi matki powinno zostać zarezerwowane jako badanie przesiewowe drugiego rzutu dla pacjentek ze zwiększonym ryzykiem aneuploidii na podstawie badań biochemicznych. Pacjentki, u których stwierdza się nieprawidłowości w badaniu USG, należy natomiast skierować bezpośrednio na diagnostykę inwazyjną [51, 58].

Podsumowanie

Badanie DNA płodu z krwi matki jest nieinwazyjne, dzięki czemu nie stwarza ryzyka poronienia. Czułość i swoistość wykrywania trisomii chromosomów 21, 18, 13 nieznacznie tylko ustępują tradycyjnemu badaniu cytogenetycznemu.

Żaden z testów, wykorzystujących płodowe DNA nie został dotychczas zarejestrowany do celów diagnostycznych. Mogą być one natomiast wykorzystywane jako testy przesiewowe,

które poprzez lepszą selekcję znacząco zmniejszą liczbę kobiet poddawanych procedurom inwazyjnym.

Obecnie dostępne testy, wykorzystujące badanie cfDNA, oceniają jedynie ryzyko wystąpienia najczęściej spotykanych trisomii, tj. trisomii chromosomów 21, 18 i 13. Być może w przyszłości będzie w ten sposób oceniane ryzyko wystąpienia także innych aneuploidii, gdyż sekwencjonowanie nowej generacji potencjalnie umożliwi badanie całego genomu płodu.

Aktualnie głównym ograniczeniem badania cfDNA jest jego wysoki koszt. Brak możliwości wykonania badania w Polsce i konieczność przesyłania próbek zagranicę znacznie wydłuża czas oczekiwania na wynik.

Piśmiennictwo

1. Driscoll D, Gross S. Clinical practice. Prenatal screening for aneuploidy. *N Eng J Med*. 2009, 360, 2556-2562.
2. Snijders R, Holzgreve W, Cuckle H, Nicolaides K. Maternal age-specific risks for trisomies at 9-14 weeks' gestation. *Prenat Diagn*. 1994, 14, 543-552.
3. Kagan K, Staboulidou I, Cruz J, [et al.]. Two-stage first-trimester screening for trisomy 21 by ultrasound assessment and biochemical testing. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2010, 36, 542-547.
4. Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploides at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn*. 2011, 31, 7-15.
5. Rekomendacje Zespołu Ekspertów PTG. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące postępowania w zakresie diagnostyki prenatalnej. *Ginekol Pol*. 2009, 80, 390-393.
6. Corrado F, Cannata M, La Galla T, [et al.]. Pregnancy outcome following mid-trimester amniocentesis. *J Obstet Gynaecol*. 2012, 32, 117-119.
7. Mujenovic F, Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villus sampling. *Obstet Gynecol*. 2007, 110, 687-694.
8. Chitty L, Hill M, White H, [et al.]. Noninvasive prenatal testing for aneuploidy—ready for prime time? *Am J Obstet Gynecol*. 2012, 206, 269-275.
9. Walknowska J, Conte F, Grumbach M. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1969, 1, 1119-1122.
10. Bianchi D, Simpson J, Jackson L, [et al.]. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. *Prenat Diagn*. 2002, 22, 609-615.
11. Lepez T, Vandewostyne M, Hussain S, [et al.]. Fetal microchimeric cells in blood of women with an autoimmune thyroid disease. *PLoS One*. 2011, 6, e29646.
12. Pearson H. Life-span of fetal red blood cell. *J Pediatr* 1967, 70, 166-171.
13. Bianchi D, Zickwolf G, Weil G, [et al.]. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996, 93, 705-708.
14. Bianchi D, Williams J, Sullivan L, [et al.]. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet*. 1997, 61, 822-829.
15. Choolani M. The promise of fetal cells in maternal blood. *B Pract Res Clin Obstet Gynecol*. 2012, 26, 655-667.
16. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain P, [et al.]. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997, 350, 485-487.
17. Hui L, Bianchi D. Recent advances in the prenatal interrogation of the human fetal genome. *Trends Genet*. 2013, 29, 84-91.
18. Bianchi D. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostics potential—a review. *Placenta*. 2004, 25, Suppl. A, S93-S101.
19. Norton M, Brar H, Weiss J, [et al.]. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study of detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol*. 2012, 207, 137.e1-8.
20. Lo Y. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*. 1998, 62, 768-775.
21. Lo YMD, Zhang J, Leung TN, [et al.]. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*. 1999, 64, 218-224.
22. Rijnders R, Christiaens G, Soussan A, van der Schoot C. Cell-free fetal DNA is not present in plasma of nonpregnant mothers. *Clin Chem*. 2004, 50, 697-681.
23. Invernizzi P, Biondi M, Battezzati P, [et al.]. Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy. *Hum Genet*. 2002, 110, 587-591.
24. Chiu R, Poon L, Leung T, [et al.]. Effects of blood-processing protocols on fetal ant total DNA quantification in Maternal plasma. *Clin Chem*. 2001, 47, 1607-1613.
25. Lo Y, Leung T, Tein M, [et al.]. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem*. 1999, 45, 184-188.
26. Lau T, Leung T, Chan L, [et al.]. Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia. *Clin Chem*. 2002, 48, 2141-2146.

Katarzyna Gorzelnik et al. Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna trisomii 21, 18 i 13 z wykorzystaniem wolnego pozakomórkowego DNA płodu.

27. Orzińska A, Guz K, Brojer E Nieinwazyjne badania prenatalne z osocza kobiet ciężarnych w konflikcie serologicznym w Polsce. *Ginekol Pol.* 2009, 80, 768-771.
28. Rijnders R, Schoot van der E, Bossers B, [et al.]. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol.* 2001, 98, 374-378.
29. Finning K, Martin P, Daniels G. The use of maternal plasma for prenatal RhD blood group genotyping. *Methods Mol Biol.* 2009, 496, 143-157.
30. Leung T, Zhang J, Lau T, [et al.]. Increased Maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem.* 2001, 47, 137-139.
31. Leung T, Zhang J, Lau T, [et al.]. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet.* 1998, 352, 1904-1905.
32. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, [et al.]. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem.* 2000, 46, 301-302.
33. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, [et al.]. Prenatal DNA diagnosis of single gene disorder from maternal plasma. *Lancet.* 2000, 356, 1170.
34. Houfflin-Debarge V, O'Donnell H, Overton T, [et al.]. High sensitivity of fetal DNA in plasma compared to serum and nucleated cells using un-nested PCR in maternal blood. *Fetal Diagn Ther.* 2000, 15, 102-107.
35. Li Y, Di Naro E, Vitucci A, [et al.]. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA.* 2005, 293, 843-849.
36. Fan H, Quake S. Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *Anal Chem.* 2007, 79, 7576-7579.
37. Lo Y, Lun F, Chan K, [et al.]. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007, 104, 13116-13121.
38. Rossa W, Chiu K, Allen Chan, [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, 20458-20463.
39. Lo Y, Lun F, Chan K, [et al.]. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007, 104, 13116-13121.
40. Fan H, Blumenfeld Y, Chitkara U, [et al.]. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008, 105, 16266-16271.
41. Ashoor G, Syngelaki A, Wang E, [et al.]. Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DNA analysis method. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013, 41, 21-25.
42. Chen E, Chiu R, Sun H, [et al.]. Noninvasive Prenatal Diagnosis of Fetal Trisomy 18 and Trisomy 13 by Maternal Plasma DNA Sequencing. *PLoS ONE.* 2011, 6, e21791.
43. Liang D, Lv W, Wang H, [et al.]. Non-invasive prenatal testing of fetal whole chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing. *Prenat Diagn.* 2013, 32, 1225-1232.
44. Verweij E, van den Oever J, de Boer M, [et al.]. Diagnostic Accuracy of Noninvasive Detection of Fetal Trisomy 21 in Maternal Blood: A Systematic Review. *Fetal Diagn Ther.* 2012, 31, 81-86.
45. Dan S, Wang W, Ren J, [et al.]. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11 105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenat Diagn.* 2012, 9, 1-8.
46. Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M, [et al.]. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012, 206, 322.e1-5.
47. Palomaki G, Decui C, Kloza E, [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, 296-305.
48. Ashoor A, Syngelaki A, Wang E, [et al.]. Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome – selective cell – free DNA analysis method. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013, 41, 21-25.
49. Nicolaides K, 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, 374.e1-6.
50. Brar H, Wang E, Struble C, [et al.]. The fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma is not affected by a priori risk of fetal trisomy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013, 26, 143-145.
51. Hui L. Non-invasive prenatal testing for fetal aneuploidy: charting the course from clinical validity to clinical utility. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013, 41, 2-6.
52. Verweij E, de Boer M, Oepkes D. Non-invasive prenatal diagnosis for Down syndrome: no paradigm shift, just better testing and it is already here! *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012, 40, 484-485.
53. Benn P, Cuckle H, Pergament E. Non-invasive prenatal diagnosis for Down syndrome: the paradigm will shift, but slowly. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012, 39, 127-130.
54. Tabor A, Vestergaard C, Lidegaard Ø. Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009, 34, 19-24.
55. Bjok J, Szyszka M, Michalowska A, Roszkowski T [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, 145-152.
56. Silver R, Blum K, Geibel L, [et al.]. Clinical implications of atypical chromosome abnormalities diagnosed prenatally. *Obstet Gynecol.* 1999, 94, 925-928.
57. <http://lifecodexx.com/yourcontactpersons0.html>
58. Devers P, Cronister A, Ormond K, [et al.]. Noninvasive Prenatal Testing/Noninvasive Prenatal Diagnosis: the Position of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns.* 2013, 22, 291-295.
59. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 545: Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol.* 2012, 120, 1532-1534.