

Neštandardné výsledky neinvazívneho prenatalného testu na chromozómové poruchy plodu môžu poskytovať doplňujúcu informáciu o zdravotnom stave tehotných žien

RNDr. Tomáš Szemes, PhD.^{1,2}, RNDr. Michaela Hýblová^{1,2}, MUDr. Jana Barošová³, RNDr. Gabriel Minárik, PhD.⁴, Werner Krampfl¹

¹Geneton, s. r. o., Bratislava

²Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

³MUDr. Janka Barošová – GENET, s. r. o., Nitra

⁴Medirex, a. s., Pezinok

Neinvazívne prenatalné testovanie (NIPT) na najčastejšie aneuploidie pomocou analýzy voľnej DNA získanej z periférnej krvi tehotných žien predstavuje jeden z najrýchlejšie sa presadzujúcich nových genetických testov. O prítomnosti voľnej DNA plodu v periférnej plazme tehotných žien vieme od roku 1997, no vzhľadom na jej malý podiel trvalo 14 rokov, kým sa stal dostupným prvý test na stanovenie najčastejších trizómií. Dnes existuje viacero dostupných NIPT metód, ktoré rôznymi spôsobmi detegujú zmeny početnosti sledovaných chromozómov v porovnaní s referenčnými chromozómami. Úspech NIPT spočíva vo vysokej citlivosti na najčastejšie aberácie, v prípade trizómie 21 nad 99 %, a v nízkej miere falošne pozitívnych výsledkov. Svetovo najviac používané testy sú založené na analýze s tzv. celogenómovým prístupom, pričom pomocou metódy masívne paralelného sekvenovania sa analyzuje celková DNA získaná z periférnej plazmy tehotnej ženy. V našom laboratóriu sme v roku 2015 zaviedli test, ktorý využíva celogenómový prístup. Primárne bol navrhnutý na detekciu trizómie 21, 18 a 13. Pri vhodnom spôsobe interpretácie dát však možno získať detailný prehľad o stave všetkých chromozómov a zistiť aj malé aberácie. Vďaka zavedeniu takejto interpretácie pri NIPT sme zachytili prípad pacientky, u ktorej sme pozorovali viacpočetné subchromozómové aberácie na viacerých chromozómoch. Existuje viacero možných príčin na pozorovanie takýchto zmien – aberácie pochádzajúce z miznúceho dvojčťa, okultná malignita, ale aj systémový lupus erythematosus (SLE). Pri hodnotení neštandardných výsledkov NIPT testov je kľúčové získanie dodatočných klinických dát na stanovenie príčiny. Celogenómové testy NIPT však môžu poskytnúť doplňujúce informácie aj k zdravotnému stavu tehotnej a môžu byť cenným nástrojom prevencie aj pri diferenciálnej diagnostike. **Kľúčové slová:** neinvazívne prenatalné testovanie, NIPT, voľná fetálna DNA, chromozómové aberácie, celogenómové sekvenovanie, okultná malignita, systémový lupus erythematosus, SLE

Abnormal results of non-invasive prenatal test for common foetal aneuploidies can provide additional information about medical conditions in pregnant women

Non-invasive prenatal testing (NIPT) for common foetal aneuploidies based on analysis of circulating free foetal DNA obtained from peripheral maternal blood represents one of the most rapidly adopted genetic tests. We are aware that free foetal DNA is present in maternal blood since 1997 but due to its low relative amount it took 14 years until the first commercial test became available. Various NIPT tests are currently available which use different approaches to detect changes in tested chromosome counts compared to reference chromosomes. The success of NIPT lies in the high detection rate of the most common aneuploidies, in case of trisomy 21 above 99%, and low false positive rate compared to other screening methods. The most common NIPT test worldwide is based on so called whole genome approach, which is based on massively parallel sequencing of total DNA isolated from peripheral plasma of a pregnant woman. We implemented an in-house NIPT test in our laboratory in 2015, which also uses whole genome approach. It was primarily designed for detection of trisomies 21, 18 and 13. Using an alternative interpretation of the entire genome analysis is possible to study all chromosomes and identify aberrations of small extent. Due to the implementation of such analysis we identified a case of a pregnant woman with various subchromosomal aberrations on different chromosomes. Following conditions can lead to such abnormal results – aberrations of demised aberrant twin, occult maternal malignancy, or systemic lupus erythematosus (SLE). Additional clinical information may be needed to determine causative condition. Whole genome NIPT tests can be a source of a valuable information for differential diagnosis of various clinical conditions of pregnant women or even prevention.

Keywords: non-invasive prenatal testing, NIPT, free foetal DNA, whole genome sequencing, chromosomal aberrations, occult malignancy, systemic lupus erythematosus, SLE

Newslab, 2017; roč. 8(1): 30 – 33

Úvod

V roku 1997 bola v periférnej krvi tehotných žien objavená voľná DNA pochádzajúca z plodu⁽¹⁾. Táto DNA však nie je priamo uvoľňovaná plodom, ale bunkami cytotrofoblastu placenty, ktoré odumrú v procese apoptózy⁽²⁾. NIPT predstavuje pokročilý skriningový test, nie však diagnostický test, pretože môže viesť k falošne pozitívnym alebo menej často k falošne negatívnym výsledkom. Práve placentárny pôvod a fenomén placentárneho mozaicizmu zodpovedajú za malú mieru diskordantných výsledkov NIPT a skutočného karyotypu plodu a sú jednou z biologických príčin nesprávneho výsledku NIPT⁽³⁾. Ďalšou z príčin falošne pozitívnych výsledkov NIPT je syndróm miznúceho dvojčata, pretože u miznúceho dvojčata je vyšší výskyt aneuploidii a príslušná časť placenty uvoľňuje aberantnú DNA⁽¹¹⁾. Nízky podiel DNA plodu (menej ako 4 %) môže byť príčinou falošne negatívneho výsledku. DNA získaná z plazmy je zmesou dominujúcej materskej DNA a DNA plodu, ktorá predstavuje priemerne len okolo 10 – 20 % medzi 10. a 21. týždňom tehotenstva⁽⁴⁾. Výsledok NIPT môže byť preto ovplyvnený aj aberantným genotypom matky (napr. mozaicizmus). Až v roku 2008 bola prvýkrát publikovaná nová metóda analyzujúca cirkulujúcu DNA v krvi tehotnej pomocou sekvenátorov novej generácie, vďaka ktorej bolo možné s vysokou spoľahlivosťou odlišiť trizomické plody od euploidných⁽⁵⁾. Bol založený na celogenómovom sekvenovaní voľnej cirkulujúcej DNA, priradení sekvencií k jednotlivým chromozómom a následnému porovnaniu pomerov sledovaných a referenčných chromozómov s pomermi zistenými pre súpravu vzoriek euploidných tehotenstiev. Prvý komerčne dostupný NIPT test prišiel v roku 2011 a odvtedy došlo k veľkému nárastu počtu vyšetrených tehotných, ako aj k dostupnosti rôznych NIPT⁽⁶⁾. Prax ukázala prínos NIPT metód vo vysokej citlivosti a špecificite častých chromozómových porúch plodu v porovnaní so štandardným skriningom a NIPT predstavuje najspoľahlivejšiu metódu v prípade, že tehotná nie je ochotná podstúpiť amniocentézu⁽⁷⁾.

NIPT testy však nesú predovšetkým genomickú informáciu o tehotnej žene. Práca Bianchi a kol.⁽⁷⁾ poukazuje na zachytenie ešte neidentifikovaných desiatich prípadov materskej malignity u tehotných žien v rámci poskytovania komerčného NIPT testu, ktoré boli pri následnom klinickom manažmente aj potvrdené. Maligne bunky totiž do obehu uvoľňujú DNA podobne ako placenta, pričom tumorové tkanivo je často tvorené bunkami s viacpočetnými chromozómovými aberáciami. Malignita však nie je jedinou možnou príčinou zachytenia abnormálneho NIPT chromozómového profilu. Chan a spol.⁽⁸⁾ v roku 2015 poukázali na to že aj systémový lupus erythematosus (SLE) spôsobuje viacpočetné aberantné chromozómové artefakty pri celogenómovej analýze DNA z placenty. Táto práca poukazuje na zachytený prípad tehotnej s prítomnými viacpočetnými chromozómovými aberáciami zistenými pomocou NIPT testu⁽⁹⁾ s rozborom možných príčin. Práve schopnosť zachytiť iné aberácie okrem testovaných vnímame ako hlavnú výhodu celogenómového prístupu pri NIPT skriningu.

Materiál a metódy

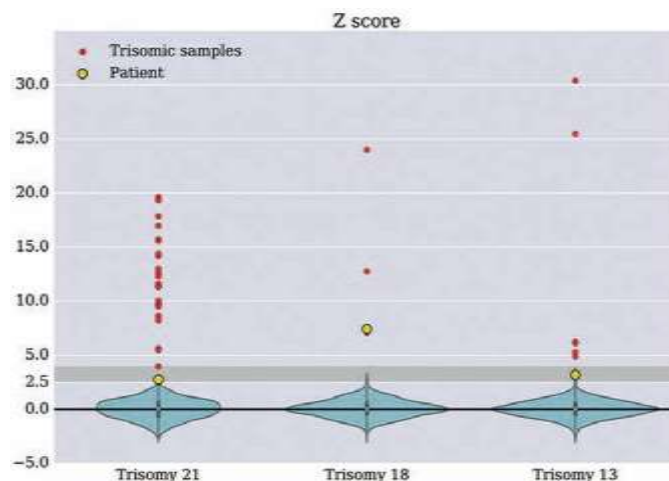
U pacientky vo veku 32 rokov, po in vitro fertilizácii bol indikovaný NIPT test. Odborová skúmanka s periférnou krvou odobratou do EDTA bola pripravená do laboratória a do

24 hodín z nej bola získaná čistá frakcia plazmy. Z plazmy bola izolovaná celková DNA pomocou kitu DNA Blood Mini kit (Qiagen, DE) a celý výťažok bol použitý na prípravu fragmentovej sekvenačnej knižnice s kitom TruSeq Nano (Illumina, USA) na účely masívne paralelného sekvenovania na sekvenátore Illumina MiSeq. Vykonané bolo párové sekvenovanie s dĺžkou čítania 75bp. Získané dáta zo sekvenovania boli spracované pomocou bioinformatického expertného nástroja NIPT-APP, ktorý zabezpečil kvalitatívne filtrovanie dát, mapovanie čítania k referenčnému ľudskému genómu verzie hg19, zisteniu početností čítania pre jednotlivé chromozómy, ako aj pre rovnomerné segmenty chromozómov, ktoré pomocou vlastného algoritmu boli porovnané s normálnymi početnosťami referenčných vzoriek. Na základe porovnania vzoriek s referenčnými hodnotami bolo stanovené Z skóre pre analyzované chromozómy pomocou vyvinutého algoritmu Multinomial. Na účely kontroly validity výsledkov boli výsledky vizualizované aj formou grafickej reprezentácie chromozómov na subchromozómovej úrovni pomocou nástroja Circos⁽¹⁰⁾. Vzhľadom na výsledok bol s odstupom dvoch týždňov vykonaný opakovaný odber s použitím rovnakého postupu.

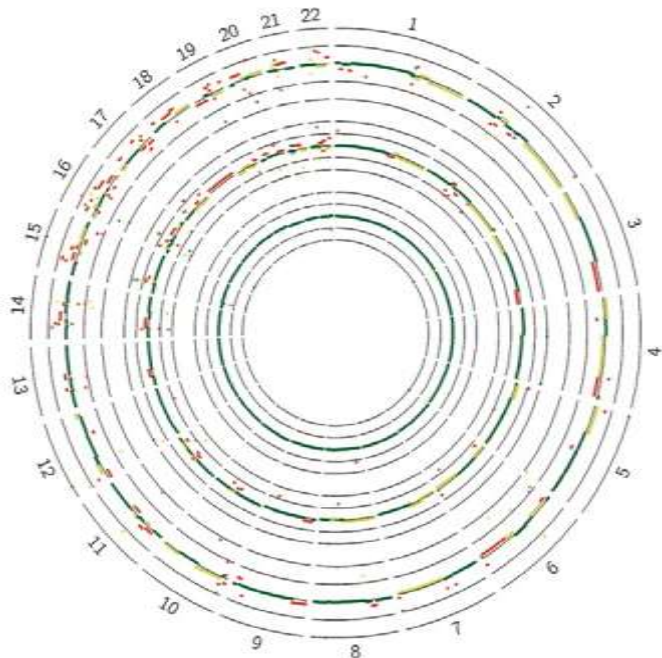
Výsledky

Pri prvej NIPT analýze vzorky sme získali 6,9 milióna párových čítaní, ktoré sa unikátne mapovali na genóm vo verzii GRCh37. Bola zistená pozitivita na trizómii chromozómu 18 (Z skóre > 6) a zároveň hodnoty Z skóre chromozómov 21 a 13 boli v sivom pásme (Z skóre medzi 2,5 a 4), čo je neštandardné (**obrázok 1**). Výsledok po 2. odbere bol rovnaký. Pomocou nástroja Circos sme hodnotili distribúciu čítania v rámci všetkých autozómov (**obrázok 2**). Pozorovali sme prítomnosť viacpočetných subchromozómových aberácií (mikrodelecie a duplikácie) na každom z chromozómov (**obrázok 1**). Pacientka bola na základe výsledkov indikovaná na amniocentézu.

Obrázok 1. Zobrazenie výsledného Z skóre stanoveného algoritmom Multinomial pre testované chromozómy 21, 18 a 13. Svetlomodrá oblasť predstavuje distribúciu Z skóre negatívnych vzoriek a červené body predstavujú Z skóre prípadov s trizómiou. Sivá zóna Z skóre od 2,5 do 4 predstavuje pásmo neinformatívnych hodnôt. Skúmaná vzorka (žlté body) mala pozitívny výsledok na trizómii 18, no atypicky aj Z skóre pre chromozómy 21 a 13 boli v sivej zóne.



Obrázok 2. Profil autozómov 1 – 22 zobrazený v kruhu pomocou nástroja Circos. Vnútorý kruh predstavuje referenčnú vzorku, stredný kruh je výsledkom NIPT prvého odberu pacientky a vonkajší kruh je výsledkom NIPT druhého odberu. Zelené oblasti predstavujú normálnu reprezentáciu sekvencií v daných oblastiach chromozómu, žlté malú a červené vyššiu odchýlku v početnosti. Posun odchýlok smerom von poukazuje na duplikované a smerom dnu deletované oblasti.



Diskusia a záver

Neinvasívne prenatálne testy v praxi preukázali vysokú citlivosť a špecificitu pri odhaľovaní najčastejších aneuploidíí plodu analýzy voľnej DNA plodu v periférnej krvi tehotných žien. Od pôvodného názoru expertov na prenatálnu starostlivosť pri využití NIPT testu ako alternatívy štandardného skríningu pre tehotné s vyšším rizikom plodu s Downovým syndrómom badať posun k názoru vhodnosti nasadenia testu ako prvej voľby skríningu na najčastejšie aneuploidie plodu. No skupina testov založených na celogenómovom skenovaní dokáže poskytnúť doplňujúce informácie, ktoré sa týkajú samotnej tehotnej ženy.

Pri poskytovaní NIPT testu v našom laboratóriu sme zachytili prípad tehotnej, ktorá mala abnormálny výsledok NIPT testu a vo vizualizácii distribúcie čítania pre všetky chromozómy sme pozorovali veľký počet subchromozómových odchýlok (duplikácií aj delécií). Okultná malignita je jedným z možných vysvetlení získania tohto neštandardného výsledku.

LITERATÚRA

- Lo YM, Corbetta N, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485-487.
- Faas BH, de Ligt J, Janssen I, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies using massively parallel sequencing-by-ligation and evidence that cell-free fetal DNA in the maternal plasma originates from cytotrophoblastic cells. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12: S19-S26.
- Grati FR, Malvestiti F, Ferreira JC, et al. Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results. *Genet Med* 2014; 16(8): 620-4.
- Taglauer ES, Wilkins-Haug L, Bianchi DW. Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta* 2014; 35: Suppl S64-8.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(42): 16266-71.
- Bianchi DW, Wilkins-Haug L. Integration of Noninvasive DNA Testing for Aneuploidy into Prenatal Care: What Has Happened Since the Rubber Met the Road? *Clinical Chemistry* 2014; 60(1): 78-87.

Masa malígneho tumoru môže mať všetky alebo subpopulácie buniek s prítomnými subchromozómovými aberáciami, ktoré v dôsledku poruchy v kontrolných a opravných mechanizmoch bunky prežívajú a množia sa. Práve pri rozpade takýchto buniek sa do cirkulácie uvoľňujú aberantné DNA tumoru a menia tak relatívne zastúpenie fragmentov v aberantných oblastiach. Viaceré práce uvádzajú zachytenie takýchto prípadov skrytej malignity v skorom štádiu v rámci NIPT, ktoré boli následne potvrdené, lokalizované, prípadne aj liečené pri ďalšom klinickom manažmente⁽⁷⁾.

Príčinou zisteného aberantného profilu však môže byť aj SLE a napriek zatiaľ nedostupným informáciám z odbornej literatúry možno predpokladať, že aj iné autoimunitné ochorenia môžu spôsobiť podobný výsledok. Pri pozorovaní abnormálneho profilu je potrebné vylúčiť SLE alebo iné autoimunitné ochorenia u pacientky. V anamnéze však pacientka neuviedla SLE.

V analyzovanom prípade treba vziať do úvahy aj tretiu alternatívnu príčinu. Tehotná žena totiž podstúpila procedúru in vitro fertilizácie, pričom boli implantované dve embryá, jedno z nich neprosperovalo. Zdrojom aberantnej DNA pozorovanej v NIPT teste by teda mohlo byť aj jedno z embryí.

Na definitívne stanovenie príčiny pozorovaného abnormálneho profilu je potrebné vykonať doplňujúce vyšetrenia a získať ďalšie anamnestické údaje. Kľúčový je výsledok z analýzy vzorky získanej z amniocentézy, vďaka čomu bude možné vylúčiť aberácie prítomné u prosperujúceho plodu. Vzhľadom na odber z vnútra plodového obalu prosperujúceho dvojčat'a pravdepodobne nebude možné zistiť, či aberantná DNA zachytená v periférnej krvi pochádza z druhého embrya. Ten však pacientka odmieta. Vzorka placenty získaná pomocou CVS a jej karyotypová analýza by mohla byť vhodnou metódou na stanovenie embryonálneho pôvodu aberantnej DNA. Definitívne však možno embryonálny pôvod aberantnej DNA potvrdiť alebo vylúčiť až po ukončení gravidity podľa vymiznutia aberantného signálu. Z anamnézy pacientky alebo špecifickými vyšetreniami bude možné preveriť hypotézu o prítomnosti SLE. Po vylúčení predchádzajúcich príčin by bolo potrebné vyšetriť okultnú malignitu.

Záver

Celogenómový prístup pri neinvasívnom testovaní na najčastejšie chromozómové poruchy môže byť významným zdrojom informácií o zdravotnom stave tehotných žien a pomôcť tak pri odhaľovaní závažných patologických fenoménov. Identifikovali sme prípad s viacpočetnými chromozómovými aberáciami s viacerými možnými príčinami vzniku, no na stanovenie ich príčiny je potrebný vhodný algoritmus diferenciálnej diagnostiky.

7. Bianchi DW, Chudova D, Sehnert AJ, et al. Noninvasive Prenatal Testing and Incidental Detection of Occult Maternal Malignancies. *JAMA* 2015; 314(2): 162-169.
8. Chan RWY, Jiang P, Peng Z, et al. Plasma DNA aberrations in systemic lupus erythematosus revealed by genomic and methylomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci* 2015; 111: E5302–E5311.
9. Minarik G, Repiska G, Hyblova M, et al. Utilization of Benchtop Next Generation Sequencing Platforms Ion Torrent PGM and MiSeq in Noninvasive Prenatal Testing for Chromosome 21 Trisomy and Testing of Impact of In Silico and Physical Size Selection on Its Analytical Performance. *PLoS One* 2015;10(12): e0144811.

10. Krzywinski M, Schein J, Birol I, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res* 2009; 19(9): 1639-45.
11. Curnow KJ, Wilkins-Haug L, Ryan A, et al. Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 212(1): 79.e1-9.



RNDr. Tomáš Szemes, PhD.

Geneton s. r. o.

Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava

e-mail: tomasszemes@gmail.com



Zdravotníctvo
moderne a efektívne

„Zavádzame a prevádzkujeme
užitočné informačné technológie
v organizáciách”

IT infraštruktúra
Infraštruktúra laboratórií
Systémová integrácia
Podnikové aplikácie
Vývoj softwaru
Outsourcing