

Limitácie neinvazívneho prenatalného testovania – falošná pozitivita

Michaela Hýblová, Gabriel Minárik

Trisomy test s.r.o., Nitra, Slovensko

Neinvazívne prenatalné testovanie (NIPT) predstavuje modernú skriningovú metódu založenú na analýze voľnej cirkulujúcej DNA placentárneho pôvodu v krvi tehotnej ženy. Vďaka vysokej citlivosti a špecificite umožňuje spoľahlivú detekciu najčastejších fetálnych aneuploidií vrátane trizómií chromozómov 21, 18 a 13. Napriek veľmi dobrým diagnostickým parametrom sa v klinickej praxi stretávame aj s falošne pozitívnymi výsledkami, ktorých biologické príčiny sú dnes pomerne dobre známe. Najčastejšou príčinou je skrytý placentárny mozaicizmus, pri ktorom je chromozómová abnormalita prítomná v placente, zatiaľ čo karyotyp plodu zostáva normálny. Keďže analyzovaná DNA pochádza prevažne z buniek cytotrofoblastu, placentárne aberácie môžu viesť k pozitívnemu výsledku NIPT bez prítomnosti fetálnej abnormality. Medzi ďalšie biologické príčiny patria maternálny mozaicizmus alebo syndróm miznúceho dvojčaťa. V práci prezentujeme reprezentatívne kazuistiky z laboratórnej praxe dokumentujúce biologické pozadie falošne pozitívnych nálezov. Uvedené prípady poukazujú na význam správnej interpretácie výsledkov v kontexte ultrazvukových, klinických a genetických vyšetrení. NIPT predstavuje vysoko presnú skriningovú metódu, avšak pozitívny výsledok musí byť vždy potvrdený invazívnou prenatalnou diagnostikou. Poznanie biologických príčin falošnej positivity je nevyhnutné pre správne genetické poradenstvo a optimálny manažment gravidity.

Kľúčové slová: Neinvazívne prenatalné testovanie, NIPT, skrytý placentárny mozaicizmus, falošne pozitívny výsledok, voľná cirkulujúca fetálna DNA, prenatalný skrining

Limitations of non-invasive prenatal testing - false positivity

Summary

Non-invasive prenatal testing (NIPT) is an advanced screening method based on the analysis of cell-free placental DNA circulating in maternal blood. Owing to its high sensitivity and specificity, NIPT enables reliable detection of the most common fetal aneuploidies, including trisomies 21, 18, and 13. Despite its excellent diagnostic performance, false-positive results are occasionally encountered in clinical practice, and their biological causes are increasingly well understood. The most common cause is confined placental mosaicism, in which a chromosomal abnormality is present in the placenta while the fetal karyotype remains normal. Because the analyzed cell-free DNA originates predominantly from placental cytotrophoblast cells, placental chromosomal abnormalities may result in a positive NIPT finding without fetal involvement. Other biological causes include maternal mosaicism and vanishing twin syndrome. We present representative cases from routine laboratory practice illustrating the biological background of false-positive NIPT results. These cases highlight the importance of interpreting NIPT findings in conjunction with ultrasound, clinical, and genetic data. Although NIPT is a highly accurate screening tool, all positive findings require confirmation by invasive prenatal diagnostic procedures. Understanding the biological mechanisms underlying false-positive results is essential for appropriate genetic counseling and optimal pregnancy management.

Keywords: Non-invasive prenatal testing, NIPT, confined placental mosaicism, false-positive result, cell-free fetal DNA, prenatal screening

Newslab, 2025, roč. 15 (2): 78-83

Úvod

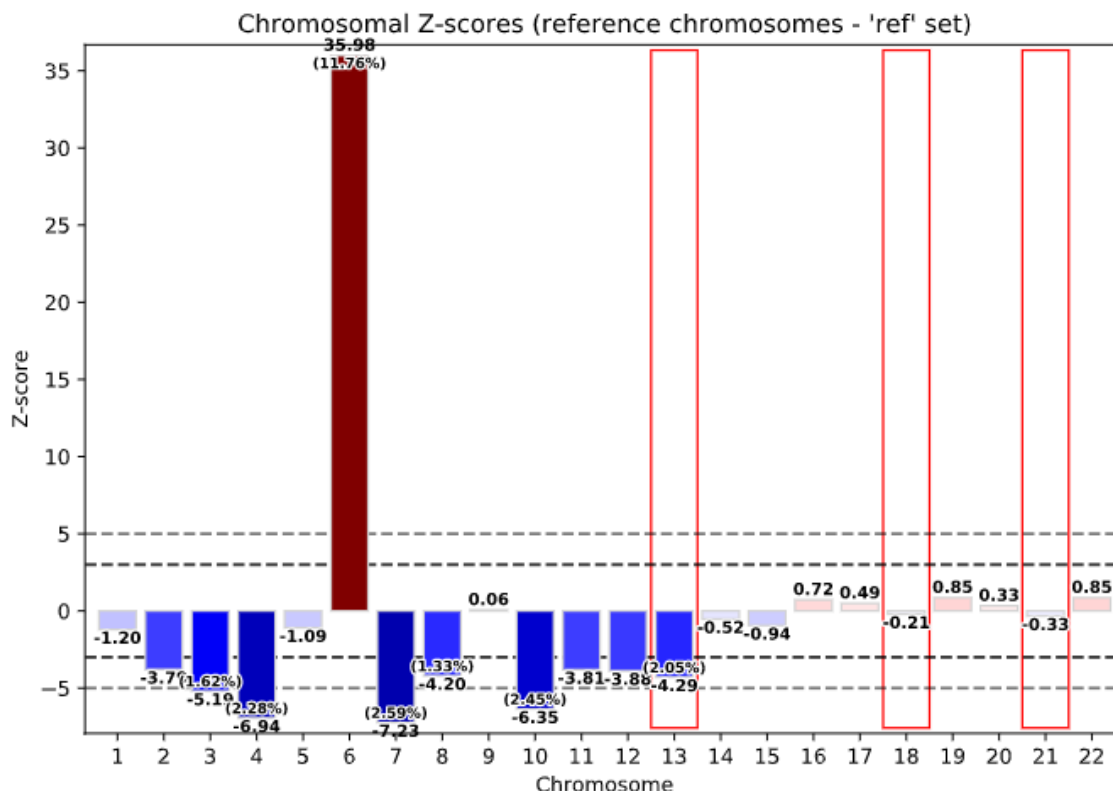
Neinvazívne prenatalné testovanie (NIPT) sa stalo široko rozšírenou pokročilou skriningovou metódou využívanou v prenatalnom skriningu na zisťovanie chromozómových abnormalít plodu, ktoré sú asociované so zmenami množstva kópií chromozómov alebo ich častí. Vychádza z analýzy voľnej cirkulujúcej „fetálnej“ DNA v krvi tehotnej (cffDNA – cell free fetal DNA). Dôležité je ale uvedomenie si stavu, že sa v skutočnosti nejedná o pôvodom fetálnu, ale o placentárnu DNA, konkrétne o DNA z buniek cytotrofoblastu placenty.

Štandardným cieľom NIPT je identifikovať predovšetkým relatívne časté a klinicky závažné trizómie, a to predovšetkým trizómiu chromozómu 21 (T21, spôsobuje Downov syndróm), trizómiu chromozómu 18 (T18, spôsobuje Edwardsov syndróm) a trizómiu chromozómu 13 (T13, spôsobuje Patauov syndróm). Okrem týchto častých trizómií umožňuje skrining aj detekciu iných, zriedkavých autozomálnych trizómií (RAT – rare autosomal trisomy), aneuploidie pohlavných chromozómov (SCA – sex chromosome aneuploidy) a pri dostatočnom rozlíšení a za splnenia špecifických, pre každú vzorku prakticky individuálnych podmienok a parametrov, aj subchromozomálnych aberácií, všeobecne známych ako

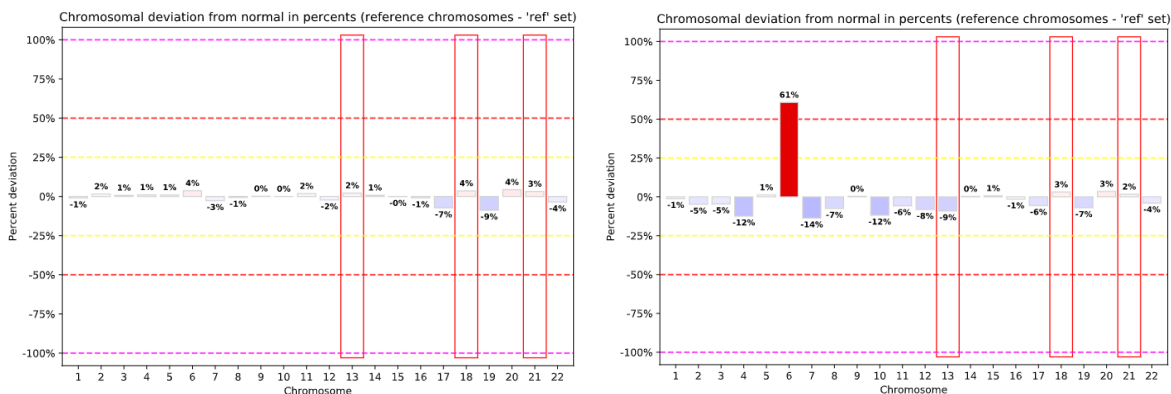
mikrodelécie a mikroduplikácie alebo tzv. varianty počtu kópií (CNV – copy number variant).

Na základe mnohých štúdií a v rôznych krajinách už dostupných skriningových programov zahrňujúcich NIPT bolo jednoznačne preukázané, že táto forma skriningu ponúka vysokú citlivosť a špecifickosť detekcie sledovaných chromozómových abnormalít a tiež, že existujú relatívne dobre popísané biologické a technické príčiny, ktoré sú zdrojom falošnej pozitivity (FP). Jej miera je však v porovnaní s inými formami skriningu veľmi nízka. V

rozsiahlych štúdiách sa sumarizovali štatistické parametre z NIPT organizovaného v rámci plošného skriningu tehotných v Holandsku a Belgicku, v ktorých boli analyzované kohorty s počtom vzoriek 73 239 a 153 575. Pre T21, T18 a T13 bola zistená citlivosť na úrovni 98 %, 91 % a 100 % (pri 239 prípadoch s vysokým rizikom pre T21, 49 pre T18 a 55 pre T13) v holandskej a 98,91 %, 97,47 % a 100 % (pri 494 prípadoch s vysokým rizikom pre T21, 115 pre T18 a 91 pre T13) v belgickej populácii. Kumulatívne pre všetky tieto tri najčastejšie trizómie bola zistená falošná pozitivita v oboch štúdiách na úrovni 0,06 %,



Obr. 1: Detekcia trizómie chromozómu 6 v rámci NIPT vyšetrenia.



Obr. 2: Detekcia trizómie chromozómu 6 s rôznou úrovňou mozaicizmu vo vzorkách z placenty; A – 0%, B – 61%, 72%, D – 83%.

prícom v najväčšej miere boli medzi falošnými pozitívnami zastúpené prípady s vysokým rizikom pre T13 1,2. V porovnateľnej miere k celkovej falošnej pozitíve NIPT prispieva detekcia SCA a mierne vyššou mierou aj RAT, ak sú súčasťou použitého testu z kategórie NIPT 3.

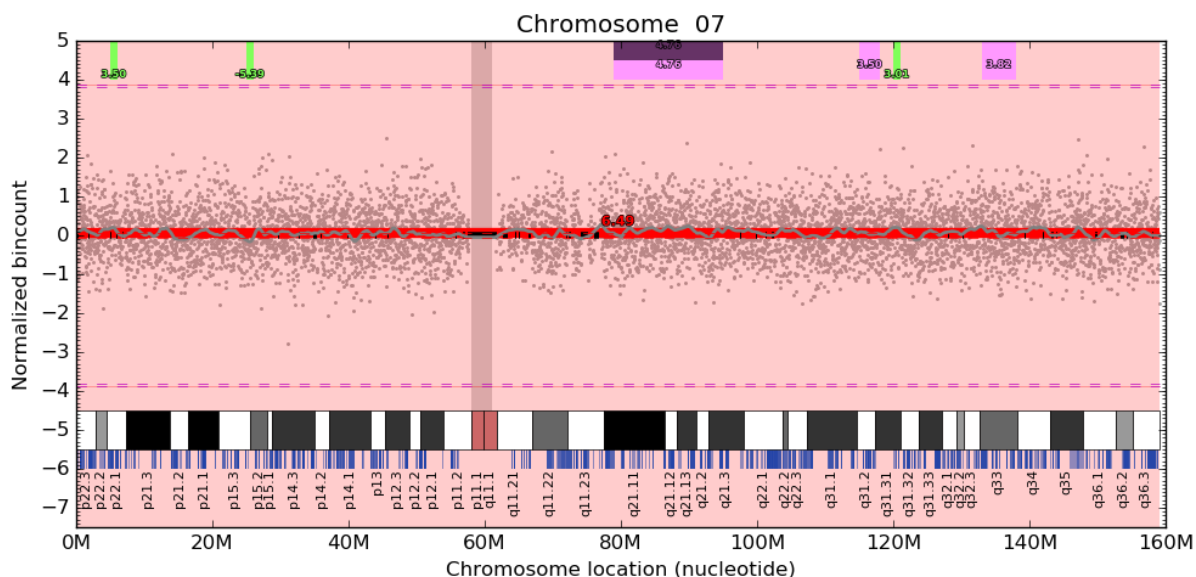
Vo všetkých prípadoch to súvisí s rôznymi biologickými fenoménmi, medzi ktorými je najviac zastúpený skrytý placentárny mozaicizmus, v menšej miere sú zastúpené maternálny mozaicizmus alebo syndróm miznúceho dvojčaťa. V tomto kontexte FP netreba vnímať ako niečo principiálne zlé, je absolútne prirodzene očakávateľná (v skutočnosti nepredstavuje ani z klinického pohľadu žiadny postrach, na rozdiel od falošnej negativity), ale treba na ňu nahliadať ako na každý iný zriedkavý biologický fenomén, ktorý má svoje príčiny a potenciálne aj následky (v

kontexte NIPT spojené s klinickým dosahom na prebiehajúce tehotenstvo alebo vývoj plodu).

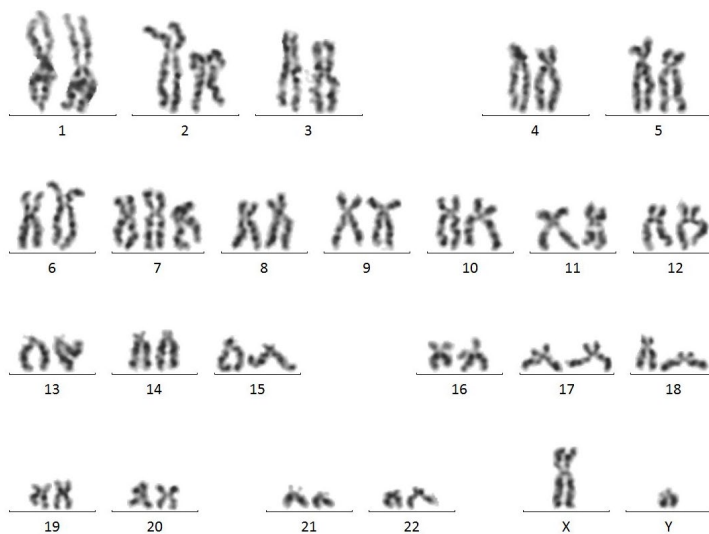
Reprezentatívne prípady z laboratórnej praxe Trisomy test laboratórií a v nadväznosti na vyššie uvedené biologické príčiny FP ilustrujeme na konkrétnych kazuistikách.

Skrytý placentárny mozaicizmus (CPM – confined placental mosaicism)

Skrytý placentárny mozaicizmus je definovaný ako prítomnosť chromozómovej abnormality v placentе, ale nie v plode. Tento stav sa potvrdí, keď cytogenetická analýza vzorky placenty alebo choriových klkov (CVS) preukáže prítomnosť bunkových línií s normálnym a abnormálnym karyotypom, ale následná analýza buniek



Obr. 3: Detekcia trizómie chromozómu 7 v NIPT analýze.



Obr. 4: Detekcia trizómie chromozómu 7 v cytogenetickej analýze získanej amniocentézou.

plodovej vody alebo fetálneho tkaniva je normálna. Keďže NIPT v skutočnosti analyzuje placentárnu DNA, abnormality obmedzené na placentu môžu viesť k falošne pozitívnym výsledkom.

Kazuistika

U 24-ročnej tehotnej sme v 14. týždni gravidity detegovali vysoké riziko trizómie chromozómu 6 (T6) na úrovni zodpovedajúcej očakávaniu reálnej detekcie (obr. 1) podľa vo vzorke stanovenej fetálnej frakcie (fetálna frakcia predstavuje podiel fetálnej DNA na celkovej cirkulujúcej DNA získanej z plazmy tehotnej a slúži ako dôležitý parameter pri hodnotení pôvodu a prípadnej úrovni mozaicizmu detegovanej aberácie). Biochemický skrining bol negatívny. V anamnéze figuroval polyhydramnion a dilatácia dutého systému plodu. Diagnostické vyšetrenie z plodovej vody pomocou stanovenia karyotypu a FISH nepotvrdil T6 u plodu. Na základe týchto voči Trisomy test výsledkom diskordantným výsledkom prenatalných analýz bolo po pôrode realizované vyšetrenie vzoriek placenty. Analyzovaných bolo celkovo 12 vzoriek, po 6 z maternálnej a fetálnej strany placenty, reprezentujúcej jej rôzne časti a vrstvy, pričom bola preukázaná prítomnosť T6 v rozsahu 0% - 83% (obr. 2). To znamená, že výsledok NIPT nebol v skutočnosti FP, ale reprezentoval reálny stav chromozómovej abnormality v placente, ktorá je zdrojom cfDNA a vyšetovaná v rámci NIPT.

Syndróm miznúceho dvojčaťa (VTS – vanishing twin syndrome)

Syndróm miznúceho dvojčaťa predstavuje situáciu, kedy sa jeden plod vo viac plodovom tehotenstve prestane vyvíjať alebo odumrie v maternici a potom sa čiastočne alebo úplne resorbuje placentou alebo druhým plodom. V krvnom obehú matky môžeme potom zachytiť prítomnú zvyškovú DNA zo zaniknutého dvojčaťa, čo v prípade prítomnosti chromozómovej abnormality u odumretého plodu môže viesť k falošne pozitívnemu výsledku NIPT vo vzťahu k prežívajúcemu plodu, ktorý je bez tejto chromozómovej abnormality. Signál reprezentujúci abnormalitu by mal s pokračujúcim tehotenstvom a postupnou resorpciou odumretého plodu slabnúť až úplne vymiznúť, preto je namieste v takýchto prípadoch realizovať vyšetrenie NIPT opakovane a s odbermi s dostatočným časovým odstupom, aby bolo možné sledovať aj dynamiku signálu detegovanej aberácie a v ideálnom prípade ju korelovať aj s opakovaným ultrazvukovým vyšetrením tehotnej.

Kazuistika

U 41-ročnej tehotnej sme v 16. týždni u dvojplodovej gravidity s ultrazvukom potvrdeným VTS, identifikovali signál trizómie chromozómu 7 (T7) na úrovni 1,9% fetálnej frakcie (obr. 3) a tiež signál chromozómu Y, ktorý poukazoval na aspoň jeden plod mužského pohlavia v danom tehotenstve. Po opakovanom odbere došlo k strate

signálu T7 a výsledok analýzy zodpovedal plodu ženského pohlavia (s fetálnom frakciou 18,96%). Následne vykonaná amniocentéza a analýza získaných vzoriek detegovala po cytogenetickej analýze u jedného z plodov T7 s nálezom 47,XY,+7 (obr. 4), druhý plod bol 46,XX. V takomto prípade je T7 možné interpretovať ako jednoznačne patogénny nález vo vzťahu k odumretému plodu. To znamená, že výsledok NIPT nebol v skutočnosti FP, ale reprezentoval reálny stav chromozómovej abnormality v danom špecifickom prípade a v tomto tehotenstve v čase, kedy bola vzorka tehotnej odoberaná.

Chromozómové abnormality matky

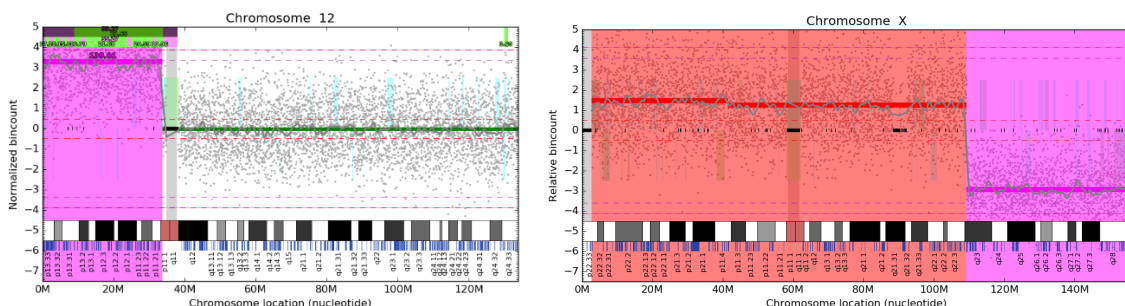
Chromozómové abnormality matky vrátane ich mozaikovej formy (zriedkavo aj takých, ktoré sú spôsobené premalígnym alebo malígnym ochorením matky) sú relatívne častou príčinou falošne pozitívnych výsledkov, ktoré dokážu ovplyvniť výsledok NIPT. V ideálnom prípade a nešpecificky je možné maternálny nález odlíšiť od fetálneho na základe rozdielu medzi úrovňou signálu detegovanej abnormality a v rámci NIPT zistenou fetálnou frakciou, pričom je signál tejto detegovanej abnormality významne vyšší.

Kazuistika

U 26-ročnej tehotnej v 17. týždni gravidity po IVF s darovanými oocytmi sme pomocou NIPT identifikovali dva rozsiahle nálezy – trizómiu 12p a deléciu Xq25-q28 (obr. 5), ktorých signál výrazne prevyšoval v NIPT zistenú fetálnu frakciu. Konfirmačné vyšetrenie z plodovej vody nepreukázalo žiadny nález u plodu. Cytogenetické vyšetrenie z periférnej krvi tehotnej preukázalo rozsiahlu balansovanú prestavbu 46,XX,der(X)t(X;12)(q23;p11.1). Trizómia krátkeho ramena chromozómu 12 nebola vyjadrená vo fenotype tehotnej, čo možno vysvetliť inaktíváciou tej kópie X, ktorá obsahovala translokované rameno 12p, no zároveň rozsiahla delécia na chromozóme X bola jasne prepajiteľná s neplodnosťou tehotnej.

Okultná malignita matky

Detekcia viacnásobných chromozómových abnormalít naprieč celým genómom môže indikovať premalignitu alebo malignitu matky. Okultná malignita matky počas tehotenstva je veľmi zriedkavá. Predpokladaná incidencia okultnej malignity stanovená prostredníctvom NIPT je približne 1:10 000 1,4, no v skutočnosti je až desaťnásobne vyššia. Citlivosť NIPT metód pre detekciu malignity je preto vo všeobecnosti nízka a preto nie sú vhodné na skrining onkologických ochorení, na druhej strane majú vysokú pozitívnu prediktívnu hodnotu, podľa niektorých štúdií je to takmer 70% v závislosti od použitej technológie 1,5. Na základe rozsiahlych populačných retrospektívnych štúdií sa ukázalo, že najčastejšie identifikovanými typmi rakoviny sú lymfómy, po ktorých nasleduje rakovina prsníka. Zatiaľ čo rakovina prsníka je hlavným typom rakoviny u žien v reprodukčnom veku, prevaha



Obr. 5: Detekcia trizómie 12p a delécie Xq25-q28.

hematologických diagnóz prostredníctvom NIPT, ako sú lymfómy a leukémie (predstavujú takmer polovicu všetkých identifikovaných prípadov rakoviny), je pravdepodobná vzhľadom na úzky kontakt krvných nádorových buniek s materským obehom a skutočnosť, že najväčšia časť plazmatickej DNA je hematologického pôvodu 6.

Kazuistika

U 29-ročnej tehotnej v 14. týždni tehotenstva sme opakovane pomocou NIPT identifikovali profil početných chromozómových abnormalít. Diagnostické vyšetrenie z plodovej vody bolo bez patologického nálezu (obr. 6). Pacientka bola ďalej suspenzarizovaná v hematologickej ambulancii. V roku 2024 bola evidovaná s diagnózou Hodgkinov lymfóm.

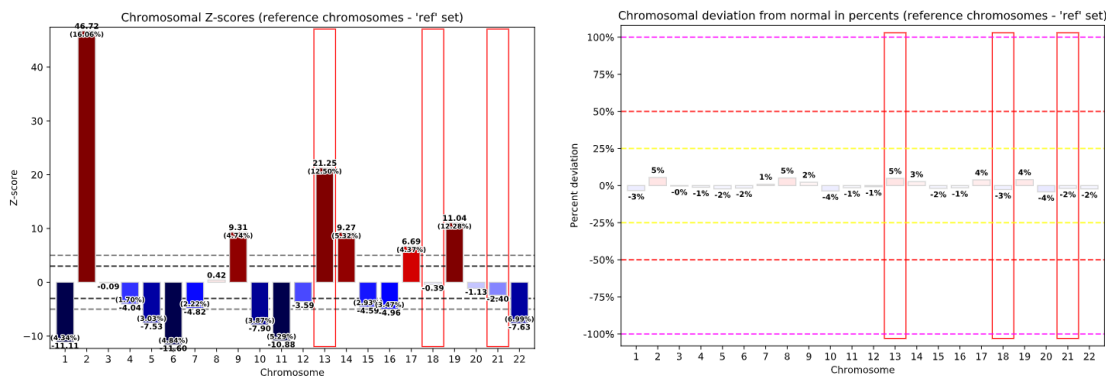
Predanalytické, analytické a technické chyby

Patria sem chyby pri odbere, transporte a spracovaní primárnych vzoriek krvi, zámena vzoriek v procese ich laboratórneho spracovania, ich kontaminácia alebo interpretácia výsledkov z nedostatočne vyplnených anamnestických údajov, ktoré môžu mať za následok nesprávne závery testu napr. chýbajúca informácia o transplantácii orgánu alebo transfúzii krvi a krvných

derivátov od mužského donora, informácia o tehotenstve po IVF (s darovaným oocytom alebo embryom). Falošne pozitívne výsledky môžu byť tiež výsledkom štatistickej náhody, keďže hranica pre pozitívny test je často určená na základe praxou stanoveného násobku štandardnej odchýlky napr. pri arteficiálne stanovenej hraničnej hodnote pre detekciu trizómií na úrovni + 3 to zodpovedá falošnej pozitívite pri 1 z 1 000 testovaných vzoriek.

Vplyv falošne pozitívnych výsledkov

Falošne pozitívne výsledky NIPT môžu mať významné psychologické a klinické dôsledky. Tehotné ženy, ktoré dostanú falošne pozitívny výsledok, môžu prežívať zbytočný stres a úzkosť. Okrem toho takýto výsledok často vedie k ďalším invazívnym zákrokom na tehotnej, ako je amniocentéza alebo odber choriových klkov (CVS), ktoré so sebou nesú vlastné riziká. V prípade nálezov ktoré majú maternálny pôvod môže pozitívny nález vyvolať sériu ďalších vyšetrení krvi, kostnej drene alebo dodatočne hematologické, biochemické ale aj zobrazovacie vyšetrenia, ktoré však môžu ozrejmiť už prebiehajúce ochorenie, ktoré nemusí mať v danom čase jasné klinické prejavy alebo je poddiagnostikované. Môže však pomôcť k rýchlejšej diagnóze, skrátiť cestu od diagnózy k liečbe alebo dokonca dokáže zachrániť život. V prípade maternálnych nálezov s možným prenosom na plod môže



Obr. 6: Okultná malignita; A – profil výsledku analýzy s detekciou mnohopočetných chromozómových abnormalít v NIPT po analýze DNA z plazmy tehotnej, B – štandardný profil získaný po analýze DNA z amniovej tekutiny.

mať zásadný dopad na každé ďalšie tehotenstvo. Zároveň môže byť v špecifických prípadoch potrebné do diagnostiky zahrnúť aj ďalších príbuzných v oboch rodičovských vetvách, aby sa doplnila rodinná anamnéza, čo je pri geneticky determinovaných ochoreniach dôležitou súčasťou zdravotnej starostlivosti prenositeľnej na ďalších členov danej rodiny.

Snaha o úplnú elimináciu FP nie je reálna a dnes takmer nesúvisí s kvalitou komerčných NIPT testov. Dá sa pracovať na zlepšení predanalytických techník, ktoré zlepšujú presnosť a kvalitu prípravy vzorky, dajú sa zlepšovať bioinformatické prístupy, ktoré zlepšujú predikciu a dokážu eliminovať falošné pozitívity vyplývajúce z technického šumu. V prípade biologických dôvodov na strane matky alebo placenty môže byť dobrým východiskom kvalitná predtestová a potestová konzultácia s odborníkom, najčastejšie klinickým

genetikom, ktorý vysvetľuje a navrhuje optimálny postup realizácie testov a inej poskytovanej zdravotnej starostlivosti. Vzdelávanie lekárov ale aj pacientov o možnosti falošne pozitívnych výsledkov a o povahe NIPT ako skriningového a nie diagnostického nástroja môže pomôcť zvládnuť očakávania.

Záver

Hoci je NIPT je účinným nástrojom prenatálneho skriningu, výskyt falošne pozitívnych výsledkov zdôrazňuje potrebu starostlivej interpretácie výsledkov a potvrdzujúceho diagnostického testovania. Pokrok v technológii a lepšie klinické postupy, ako aj dostupnosť detailných a komplexných anamnestických údajov budú naďalej znižovať výskyt falošne pozitívnych výsledkov, čím sa zvýši spotahivosť NIPT.

Literatúra:

1. van der Meij KRM, Siermans EA, Macville MVE, et al. TRIDENT-2: National Implementation of Genome-wide Non-invasive Prenatal Testing as a First-Tier Screening Test in the Netherlands. *Am J Hum Genet.* 2019;105(6):1091-1101. doi:10.1016/j.ajhg.2019.10.005
2. Van Den Bogaert K, Lannoo L, Brison N, et al. Outcome of publicly funded nationwide first-tier noninvasive prenatal screening. *Genet Med.* 2021;23(6):1137-1142. doi:10.1038/s41436-021-01101-4
3. Liehr T. False-positives and false-negatives in non-invasive prenatal testing (NIPT): what can we learn from a meta-analysis on > 750,000 tests? *Mol Cytogenet.* 2022;15:36. doi:10.1186/s13039-022-00612-2
4. Bianchi DW, Chudova D, Sehnert AJ, et al. Noninvasive Prenatal Testing and Incidental Detection of Occult Maternal Malignancies. *JAMA.* 2015;314(2):162-169. doi:10.1001/jama.2015.7120
5. Heesterbeek CJ, Aukema SM, Galjaard RJH, et al. Noninvasive Prenatal Test Results Indicative of Maternal Malignancies: A Nationwide Genetic and Clinical Follow-Up Study. *J Clin Oncol.* 2022;40(22):2426-2435. doi:10.1200/JCO.21.02260
6. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023;73(1):17-48. doi:10.3322/caac.21763

RNDr. Gabriel Minarik, PhD.

Trisomy test s.r.o.
Novozámocká 67, Nitra
Slovensko