

Paradigma-váltás a prenatalis diagnosztikában

A non-invazív, DNS-alapú prenatalis tesztelés

A klinikai alkalmazás szempontjai és tapasztalatai

Dr. med. habil. Papp Csaba
egyetemi docens

A prenatalis diagnosztika során nyerhető információ évtizedeken át változatlan volt:

- **Ultrahangvizsgálat** a magzati anatómia tanulmányozására.
- **Karyotypizálás** a magzati kromoszóma-rendellenességek (5Mb-nál nagyobb eltérések) vizsgálatára, **invazív beavatkozásokat** (CVS, amniocentesis) **követően**.

Mivel a beavatkozások alacsony, de nem elhanyagolható, 0,5–1% magzati veszteséggel járnak, és jelentős pszichés terhet jelentenek a terhesek számára, bevezetésre került a

- **Szűrés a magzati aneuploidiákra:** a magas rizikójú csoport elkülönítése különböző ultrahang-jelek és az anyai szérumban található bizonyos markerek vizsgálatával.

A magzati Down-kór szűrése és/vagy diagnosztikája áll a prenatalis genetikai diagnosztika középpontjában.

Az utóbbi évek technikai fejlődése nyomán **két új fejezet** nyílt, melyek alapvetően megváltoztatják a prenatalis diagnosztikai és genetikai tanácsadási gyakorlatot. („paradigmaváltás”)

1. Kromoszómális **mikroarray vizsgálatok**, melyek postnatalisan, vagy prenatalis invazív beavatkozásokkal nyert minta vizsgálatával lehetővé teszik a kromoszómák kicsi eltéréseinek (többség vagy hiány) igen érzékeny vizsgálatát. (5 Mb-nál kisebb eltérések, microdeletiók, duplicatiók)
2. A **magzat non-invazív genetikai tesztelése** az anyai vérplazmában lévő szabad DNS vizsgálatával. E módszer lehetővé teszi – többek között – **a magzati Down-kór magas érzékenységű tesztelését egyetlen anyai vérminta vizsgálatával**.

A jövő a kettő kombinációja: anyai vérmintából vizsgálható lesz a magzat teljes genetikai állománya, illetve annak eltérései!

Non-invazív prenatalis genetikai tesztelés (NIPT)

A magzat genetikai vizsgálata anyai vérből nyert magzati genetikai állomány (DNS) felhasználásával.

Megvalósítja az orvostudomány régi vágyát: olyan prenatalis diagnosztikus tesztet találni, ami

biztonságos az anyára és a magzatra nézve ugyanakkor **pontos** diagnózist ad a terhesség **korai** szakában.

A magzati aneuploidiák non-invazív tesztelésének (NIPT) története

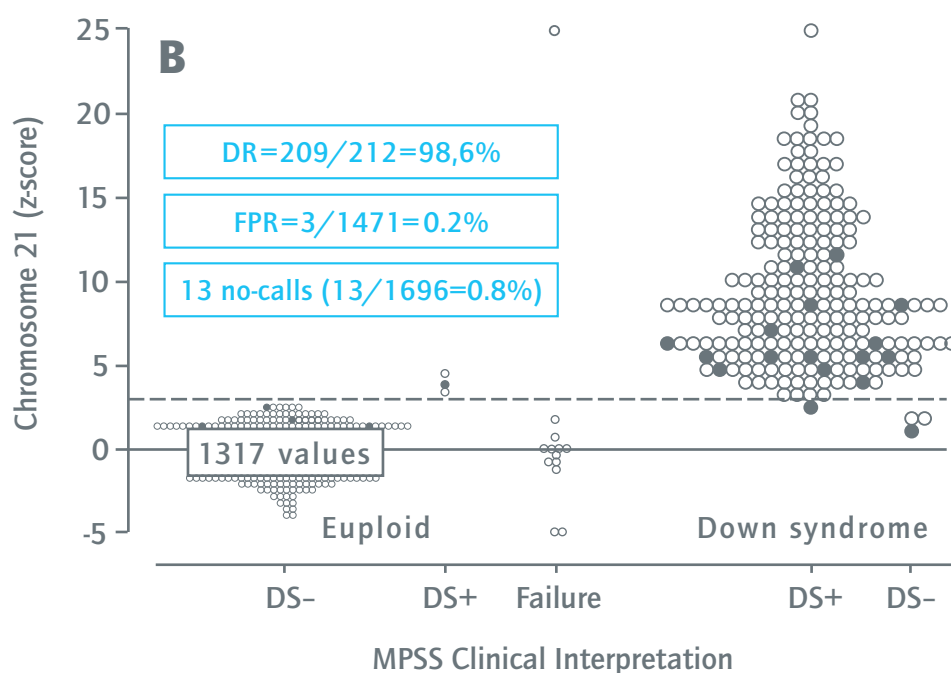
- 1997. Magzati szabad DNS (Y) kimutatása anyai vérben (nem-meghatározás anyai vérből).
- 1997–2007. Technikai lehetőségek kutatása a klinikai felhasználáshoz.
- 2007. A DNS-alapú magzati aneuploidia tesztelés lehetősége (digitális PCR, massively parallel sequencing – MPSS)
- 2008. Magzati 21-es, 18-as, 13-as triszómia kimutatása anyai vérből szabad DNS szekvenálás segítségével („proof-of-concept papers” – MPSS)
- 2008–2010. Technikai lehetőségek kutatása a széles körű alkalmazhatóságához.
- 2010–2012. Klinikai tanulmányok nagy esetszámon igazolták a magzati triszómiák kimutathatóságát anyai vérből, DNS szekvenálással, a terhesség 10. hetétől. („clinical validation studies”)
2011. október 17. [Genetics in Medicine \(Sequenom\)](#)

A Sequenom által kifejlesztett teszt magyar klinikai vizsgálattal is validált. Ezt a módszert használja a Lifecodexx a Magyarországon is elérhető PrenaTest®-ben.

DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study

Glenn E. Palomaki, PhD¹, Edward M. Kloza, MS¹, Gearlyn M. Lambert-Messerlian, PhD¹, James E. Haddow, MD¹, Louis M. Neveux, BA¹, Mathias Ehrich, MD², Dirk van den Boom, PhD², Allan T. Bombard, MD, MBA^{2,3,4}, Cosmin Deciu, MSc³, Wayne W. Grody, MD, PhD⁵, Stanley F. Nelson, MD⁶, and Jacob A. Canick, PhD¹

Genetics in Medicine • Volume 13, Number 11, November 2011.



A validálásban részt vevő magyarországi központok (SOTE I. sz. Női Klinika, POTE Női Klinika)

Genetics in Medicine • Volume 13, Number 11, November 2011.

Detecting Down syndrome in maternal plasma

Table 1 Clinical sites enrolled in the study, along with related enrollment and outcome information

Enrollment site	Location	Clinical investigator	Singleton pregnancy			Patients enrolled
			Down syndrome	Normal karyotype	Other	
North York General Hospital	Toronto, Canada	Wendy S. Meschino, MD	41	651	86	778
Istituto G. Gaslini	Genoa, Italy	Pierangela De Biasio, MD	27	492	35	554
Hospital Clinic Barcelona	Barcelona, Spain	Antoni Borell, MD, PhD	24	291	44	359
Centrum Lekarske Genetiky	Ceske Budejovice, Czech Republic	David Cutka, MD	14	362	19	395
Hospital Italiano	Buenos Aires, Argentina	Lucas Otano, MD, PhD	13	68	14	95
Dalhousie University	Halifax, Canada	Michiel Van den Hof, MD	12	115	18	145
Rotunda Hospital	Dublin, Ireland	Fergal Malone, MD	12	70	12	94
Semmelweis University	Budapest, Hungary	Csaba Papp, MD, PhD	10	64	9	83
IMALAB s.r.o. Medical Laboratories	Zlin, Czech Republic	Jaroslav Loucky, RNDr	9	238	8	255
CEMIC	Buenos Aires, Argetnina	Maria Laura Igarzabal, MD	8	224	49	281
University of Iowa	Iowa City, IA	Kristi Borowski, MD	8	135	30	173
Women & Infants Hospital	Providence, RI	Barbara O'Brien, MD	6	99	21	126
University of Pécs	Pécs, Hungary	Béla Veszprémi, MD, PhD	4	172	31	207
University of Alabama at Birmingham	Birmingham, AL	Joseph Biggio, MD	4	169	20	193
Rambam Medical Center	Haifa, Israel	Zeev Weiner, MD	4	133	10	147
Cedars Sinai PDC	Los Angeles, CA	John Williams, MD	3	192	28	223
Northwestern University	Chicago, IL	Jeffrey Dungan, MD	3	88	11	102
Henry Ford Hospital	Detroit, MI	Jacquelyn Roberson, MD	3	74	14	91
University of Virginia	Charlottesville, VA	Devereux N. Saller, Jr, MD	3	21	8	32
University of British Columbia	Vancouver, Canada	Sylvie Langlois, MD	2	67	14	83
Intermountain Healthcare	Salt Lake City, UT	Nancy Rose, MD	2	67	9	78
Brigham and Women's Hospital	Boston, MA	Louise Wilkins-Haug, MD	2	21	8	31
Baylor College of Medicine	Houston, TX	Anthony Johnson, DO	2	20	0	22
Yale University	New Haven, CT	Maurice J. Mahoney, MD, JD	1	31	9	41
New Beginnings Perinatal Consultants	Providence, RI	Marshall Carpenter, MD	1	7	4	12
University of Calgary	Calgary, Canada	Jo-Ann Johnson, MD	0	52	5	57
Royal North Shore Hospital	Sydney, Australia	Vitomir Tasevski, PhD	0	7	0	7

A PrenaTest®

Európában egyedülállóan akkreditált (CE jelzés) non-invazív, szabad magzati DNS-meghatározáson alapuló teszt.

Európai multicentrikus klinikai vizsgálatokkal validált.

Random DNS-szekvenálási technikát (MPS) alkalmaz.

A *LifeCodexx* Európa legnagyobb szekvenálási cégével, a német *GATC*-vel közösen végzi a vizsgálatokat, együttműködő partnere az amerikai *Sequenom*.

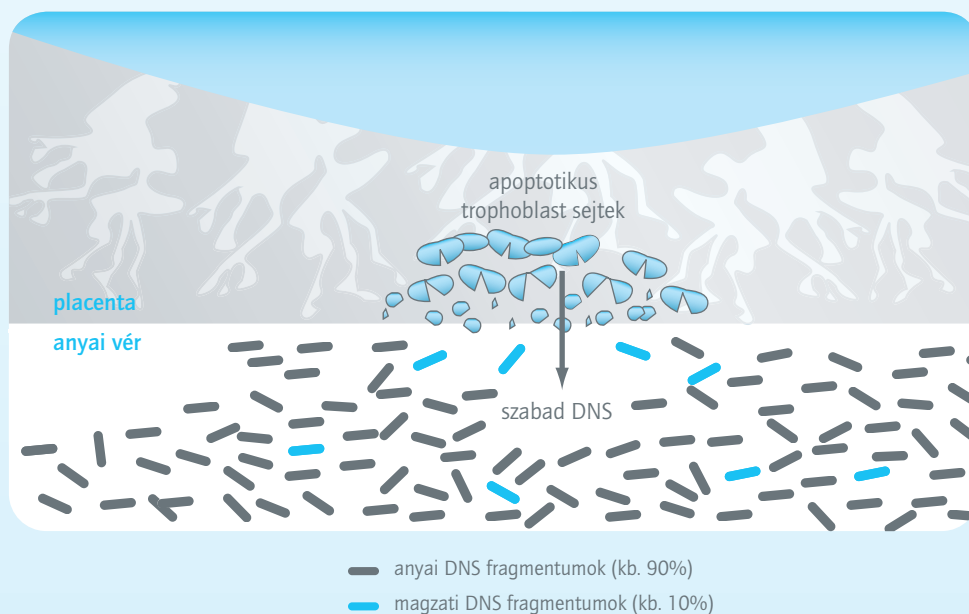
A PrenaTest® tudományos háttere

1997. (Lo et. al.) Magzati szabad DNS-szakaszok azonosítása az anyai vérben

- | | | |
|----------------------|----------------------|---|
| A szabad magzati DNS | - észlelhető | a 4. terhességi héttől |
| | - mennyisége | 2-40% (~10% a 11. héten) |
| | - stabilitása | $T_{1/2} < 2$ óra |
| | - fizikai jellemzői: | rövid szakaszok (80%-a < 200 bp)
a trophoblastsejtek apoptosisa/necrosisa során kerül az anyai vérbe |

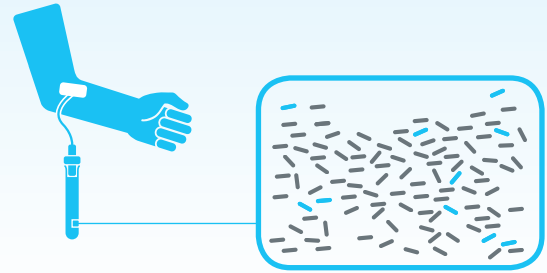
Az anyai vér magzati (lepényi) és anyai szabad DNS-szakaszokat is tartalmaz!

Az anyai vérben található szabad DNS eredete



A PrenaTest® kivitelezése – áttekintés

1. Vérgyűjtés
2. Plazma preparálás
3. Szabad DNS kiválasztása
4. Genom-könyvtár képzése
5. Újgenerációs szekvenálás



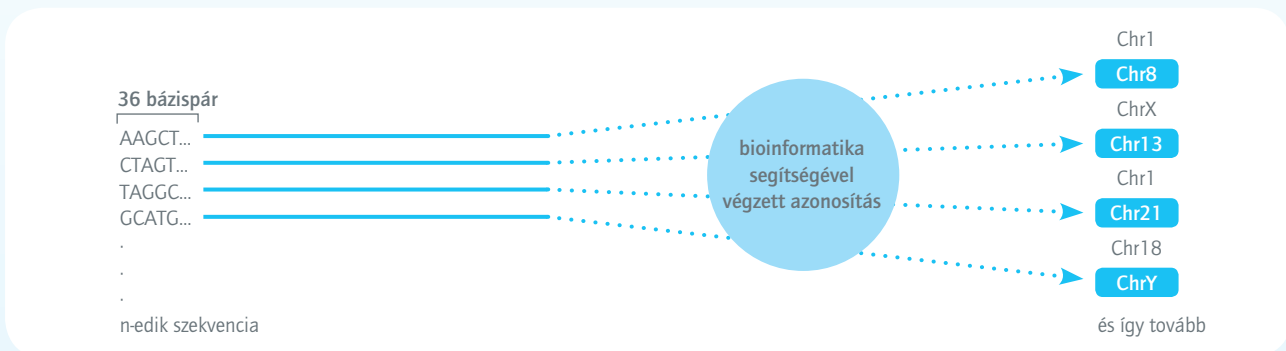
Az anyai és magzati szabad DNS-szakaszok keverékének vizsgálata az anyai plazmában



36 bp
AAGCT...
CTAGT...
TAGGC...
GCATG...

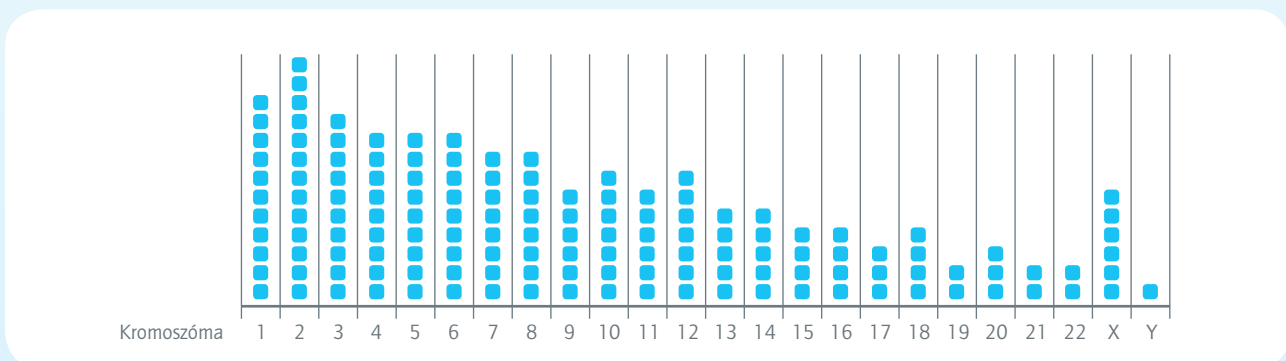
PrenaTest® – a szekvenált adatok bioinformatikai analízise

Szekvenálás és a szekvenciák azonosítása



A DNS genom struktúrájának vizsgálatával azonosítható, hogy az adott fragmentum mely kromoszómáról származik

A szekvenciák számlálása



A beazonosított DNS-szakaszok rendezésével vizsgálható a számbeli kromoszóma-hiba (trisómia) okozta DNS-többlet

A PrenaTest® bioinformatikai analízise

Mintánként („single read sequencing”)

A program mintegy 14,8 millió, 36 bázispár hosszúságú DNS-szakasz leolvasását végzi (ez a humán genom 8 %-a) (12 plex)

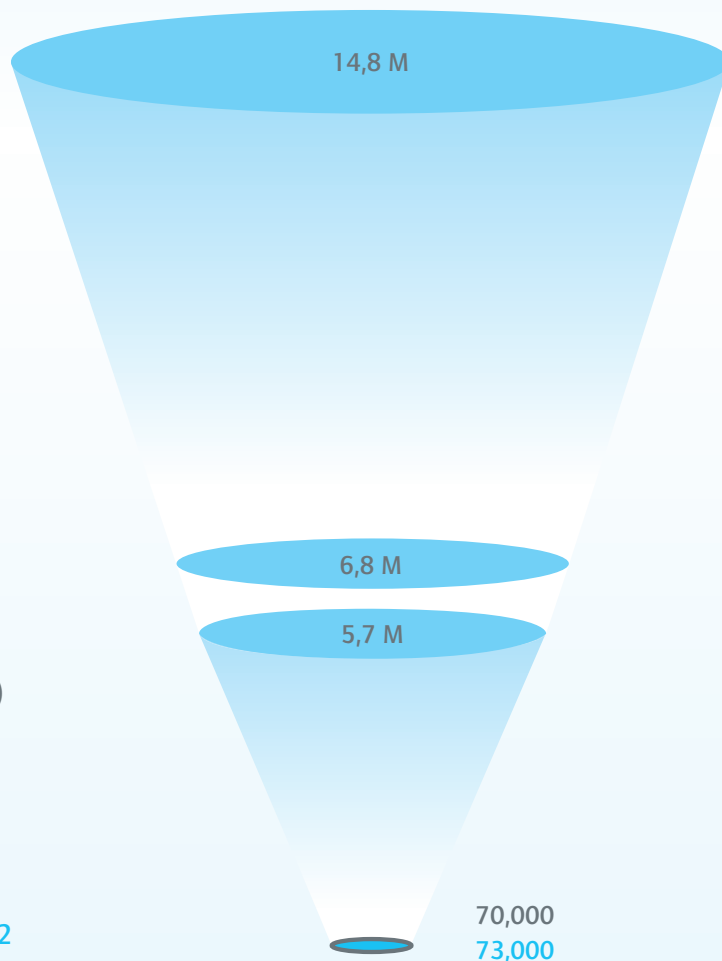
Melyből 6,8 millió leolvasás egyetlen ponthoz illeszkedik a referencia genomon („unique reads”)

Ebből kb. 5,7 millió leolvasás illeszkedik a humán genomhoz pontosan („unique without mismatch”)

Ebből kb. 70 000 leolvasás tartozik a 21-es kromoszómához euploid magzat esetén és

73 000 leolvasás triszómiás magzat esetén

% chr21 (euploid): **1,25 vs.** % chr21 (T21): **1,32**
csak 1,05-ször több!



A minőségi kontroll különböző lépései a PrenaTest® végzésekor

Minőségi kontroll biztosítása a vérvétel során (standard körülmények)

- 2 db speciális Streck cső vonalkóddal, névvel, születési idővel ellátva
- >10 ml vér csövenként
- teljesen kitöltött és aláírt beleegyező nyilatkozat
- 9–20. terhességi hét

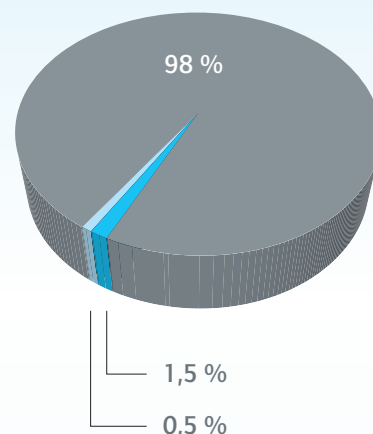
Minőségi kontroll biztosítása a genetikai vizsgálat során

- >4 ml plazma izolálása
- az izolált szabad DNS >4%-a magzati eredetű legyen
- a DNS-szekvenáláshoz megfelelő nagyságú (250–300 bázispár) és mennyiségű (2 nmol) könyvtár létrehozása
- mintánként 10–30 millió leolvasás
- ennek min. 43%-a illeszkedik hibátlanul a humán genomhoz
- az illeszkedő leolvasásoknak min. 75%-a kizárólagosan illeszkedik a humán genom pontjaihoz

PrenaTest® tapasztalatok 2012. augusztusától

- ~ 12000 vizsgált minta két év alatt
- **98%-ban negatív** eredmény T21-re, T18-ra vagy T13-ra
- **1,5%-ban pozitív** T21-re, T18-ra vagy T13-ra
- **0,5% nem informatív** az alacsony magzati DNS koncentráció miatt
- **fals pozitív arány = 0,14%; detekciós ráta = 99,6%**

Mivel Down-kórra magas rizikójú terhesekről van szó, valamennyi esetben invazív beavatkozást tanácsoltunk volna, míg a PrenaTest® alkalmazásával csak a terhesek ~2%-ában történt invazív vizsgálat!



A NIPT alkalmazásának jogi és technikai szempontjai

Az újgenerációs szekvenáláson alapuló aneuploidia-tesztelés jogi szabályozása Európában

Az DNS-alapú aneuploidia tesztelés az EU in Vitro Diagnosztikai Direktívája (98/79/EG) szabályozása alá esik. Ennek értelmében:

- az elemező szoftvernek az arra kijelölt szervezet által kiadott **CE jelzéssel kell rendelkeznie**
- a vizsgálatot kínáló cégnek rendelkeznie kell egy átfogó európai minőségbiztosítási rendszerrel (EN ISO 13485)

Európában jelenleg csak a PrenaTest® és az azt forgalmazó Lifecodexx felel meg ezeknek a követelményeknek, ezért a PrenaTest® az egyetlen, az uniós szabályoknak megfelelő non-invazív prenatalis DNS-alapú aneuploidia-teszt Európában.

Európai engedéllyel nem rendelkező vizsgálat elvégzése esetén, a vizsgálatot kérő orvos viseli a felelősséget egy esetleges téves eredményért!

A fals pozitív esetek elemzése NIPT esetén

I. Biológiai magyarázatok – (az anyai keringésben valóban jelenlévő kóros mennyiségű DNS-t detektál a NIPT, de a DNS nem a magzatot reprezentálja)

- Placentára lokalizálódó mozaikosság észlelése (mint CVS esetén)
- Meglévő, nem ismert anyai kromoszóma-rendellenesség detektálása (pl. mozaik aneuploidia, nemi kromoszóma-rendellenesség)
- Anyai tumorról a keringésbe jutott aneuploid kromoszóma-készletből származó DNS detektálása NIPT során
- Elhalt iker magzatról származó DNS detektálása

Ezekben az esetekben fontos a genetikai vizsgálatot végző laboratórium és a terhest gondozó klinikus sürgős konzultációja a körülmények tisztázása és a szükséges vizsgálatok megbeszélése céljából!

II. Laboratóriumi hibák (a feldolgozás, az értékelés során)

A fals negatív esetek elemzése NIPT esetén

I. Biológiai okok

- Alacsony (<4%) a magzati eredetű DNS *aránya* az anyai plazmában. (Túlsúlyos terheseknél gyakrabban fordul elő, mert 1. több zsírséjt pusztul el, így nagyobb a zsírséjtek apoptózisa által a keringésbe jutott anyai DNS mennyisége \rightarrow relatíve alacsony a magzati DNS aránya; 2. nagyobb a térfogat, dilúciós hatás.)

Fontos a magzati DNS-frakció pontos meghatározása és szükség esetén azonnali jelzése a vérévételi központnak!

- Mozaikosság (kismértékű, alacsony arányú, magzatra lokalizálódó)

II. Laboratóriumi hiba (?)

a módszer jelenlegi szintjének korlátai, a szekvenálás mélységének növelésével számuk csökken

A DNS-alapú Down-tesztelés hatása a prenatalis diagnosztikára I.

Jelenlegi szűrés (fenotipikus megközelítés) – példa

Hagyományos DS szűrőteszt \rightarrow DR=80%, FPR=5%
100 000 terhesség, prevalencia 1/500 (\rightarrow 200 DS eset)

160 DS eset (80%) magas rizikójú lenne a szűrőteszt alapján (DR).
5000 euploid eset (5%) magas rizikójú lenne a szűrőteszt alapján (FPR)
5160 GAC/ CVS történne, ebből 160 +, 5000 -, a $PPÉ=160/5160=3,1\%$ (1/33).
Az 5000 nem DS esetenél végzett GAC/ CVS miatt **50 magzatot (1%) veszítenénk el.**
Az invazív beavatkozások költsége jelentős.
A további 40 DS eset a 94840 alacsony rizikójú terhesség között lesz.

(DR = detekciós ráta, FPR = fals pozitív ráta, PPÉ = pozitív prediktív érték, DS = Down-syndroma)

A DNS-alapú Down-tesztelés hatása a prenatalis diagnosztikára II.

DNS-alapú szűrés (genotipikus megközelítés) – példa

Új szűrőteszt \rightarrow DR=99%, FPR:0,1%
100 000 terhesség, prevalencia 1/500 (\rightarrow 200 DS eset)

198 DS eset (99%) magas rizikójú lenne a szűrőteszt alapján (DR)
100 euploid eset (0,1%) magas rizikójú lenne a szűrőteszt alapján (FPR)
298 GAC/ CVS történne, ebből 198 +; 100 -, a $PPÉ=198/298=66,4\%$ (1/1,5=2/3)
A 100 nem DS esetenél végzett GAC/ CVS miatt **1 magzatot (1%) veszítenénk el.**
Az invazív beavatkozások **költsége arányosan** (5160 vs 298 - **17x**) **kevesebb.**
A további 2 DS eset a 99 802 alacsony rizikójú terhesség között lesz.

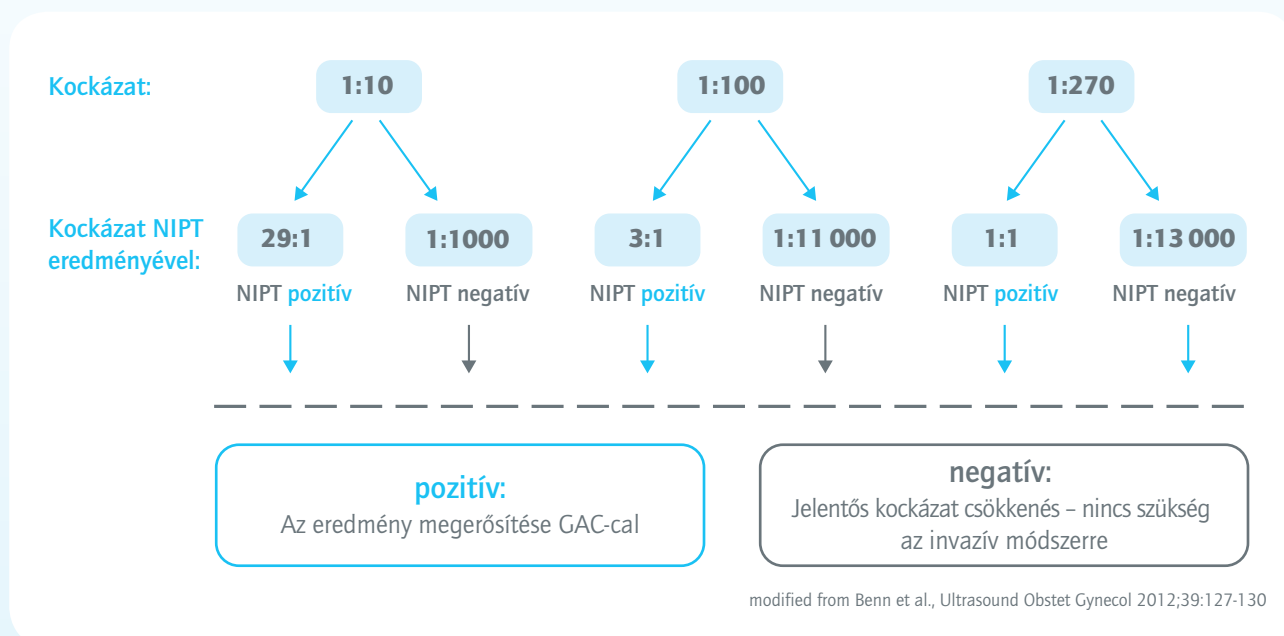
(DR = detekciós ráta, FPR = fals pozitív ráta, PPÉ = pozitív prediktív érték, DS = Down-syndroma)

A DNS-alapú Down-tesztelés hatása a prenatalis diagnosztikára III. Összegzés

Pozitív prediktív érték:	3,1% ill. 66,4%	→ 22-szeres növekedés
Felismert DS esetek száma:	160, illetve 198	→ 24%-os növekedés
Invazív beavatkozások száma:	5160, illetve 298	→ 94%-os csökkenés
Magzati veszteség:	50, illetve 1	→ 98%-os csökkenés
Beavatkozás/ DS:	33/1, illetve 3/2 (1,5/1)	→ 95,5%-os csökkenés

Hogyan módosítja a NIPT eredménye a kockázatot a magzati Down-kór előfordulására?

A NIPT segít annak eldöntésében, hogy legyen-e invazív beavatkozás a hagyományos szűrőmódszerekkel magas kockázatúnak ítélt esetekben.



Üzenet I.

Az anyai vérből történő szabad DNS-meghatározáson alapuló prenatalis diagnosztikai módszer (NIPT) fenti sajátosságai miatt

- igen fontos a megfelelő tanácsadás szerepe (preteszt- és poszteszt tanácsadás) valamint
- az európai és hazai genetikai törvények, szabályok figyelembe vétele.
- pozitív NIPT esetén szükség van az eredmény hagyományos diagnosztikus módszerekkel (általában amniocentesissel) történő megerősítésére.

Üzenet II.

Mivel a NIPT igen érzékeny módszer,

- az eredmény értékeléséhez sokszor **szükséges személyes, közvetlen konzultáció a vizsgálatot végző genetikai laboratóriummal.** (Fontos a szoros, napi kapcsolat.)
- a NIPT végzése során magas szintű és **mindenre kiterjedő minőségi kontrollra van szükség.**

Összefoglalás I.

- Az anyai vérből történő szabad DNS-meghatározáson alapuló prenatalis diagnosztika megérkezett a mindennapi klinikai gyakorlatba.
- A NIPT a hagyományos Down-szűrés módszereinél lényegesen pontosabb a leggyakoribb magzati aneuploidiák jelzésére.
- A Down-kórra magas kockázatú terheseknél alkalmazva lényegesen csökken a felajánlott invazív beavatkozások száma, így a magzati veszteség és az anyai aggodalom mértéke is.

Összefoglalás II.

- A NIPT egyaránt vizsgálja az anyai és magzati szabad DNS-t.
- A magzati eredetű szabad DNS többsége lepényi eredetű.
- A „fals pozitív” esetek jelentős részében valamilyen – általában a magzattól független – biológiai (genetikai) anomália található.– Pozitív NIPT esetén genetikai amniocentesis végzése javasolt.
- A fals negatív esetek hátterében általában a magzati eredetű szabad DNS alacsony aránya áll.
- A technikai fejlődéssel párhuzamosan várható árcsökkenés a NIPT elterjedéséhez vezet, indikációs területe is szélesedik. (→ Down-kórra alacsony rizikójú terhesek, monogénes betegségek, szerkezeti kromoszómális eltérések, ritkább aneuploidiák)

Összefoglalás III.

- Megfelelő szakember által adott tanácsadás szükséges a NIPT előtt és szükség esetén az eredmény közlésekor is.
- A későbbi nem kívánatos jogi következmények elkerülése miatt fontos az európai és hazai genetikai törvények figyelembe vétele, valamint az, hogy a vizsgálatot végző laboratórium rendelkezzen a genetikai vizsgálatokra vonatkozó európai engedéllyel.
- Fontos, hogy a NIPT-et végző genetikai laboratórium rendelkezzen a megfelelő európai akkreditációval és minden részletre kiterjedő minőségbiztosítással → jogi felelősség!
- Szükséges a vizsgálatot végző laboratóriummal való élő kapcsolat. (pl. a „váratlan” eredmények okainak gyors és hatékony kiderítése érdekében)

PrenaTest®

A jövő megérkezett
a magzati diagnosztikába

A PrenaTest® magyarországi disztribútora:



New Era Genetics

1026 Budapest, Gábor Áron utca 74-78.

Telefon: +36 1 273 0794

E-mail: info@prenatest.hu

www.prenatest.hu