

# Utilizarea testelor prenatale neinvazive în evaluarea riscului de aneuploidii fetale în sarcina gemelară cu un embrion oprit în evoluție în trimestrul I

*The use of non-invasive prenatal test in screening for fetal aneuploidies in twin pregnancies with an embryo stopped growing in the first trimester*

Sorin L. Vasilescu<sup>1</sup>,  
Petra Petrace  
Vârtej<sup>2</sup>,  
Mihai Dumitrașcu<sup>2</sup>,  
Diana I. Voicu<sup>3</sup>,  
Oana M. Bodean<sup>3</sup>,  
Liviu Popovici<sup>3</sup>,  
Roxana Bohilțea<sup>2</sup>,  
Octavian Munteanu<sup>3,4</sup>,  
Monica M. Cirstoiu<sup>2</sup>

1. Doctorand,  
Universitatea de Medicină  
și Farmacie „Carol Davila”,  
Secția de Obstetrică-  
Ginecologie III  
a Spitalului Universitar  
de Urgență București  
2. Clinica de Obstetrică-  
Ginecologie  
a Spitalului Universitar  
de Urgență București,  
Universitatea de Medicină  
și Farmacie „Carol Davila”  
București  
3. Secția de Obstetrică-  
Ginecologie III  
a Spitalului Universitar  
de Urgență București  
4. Disciplina Anatomie,  
Departamentul Științe  
Morfologice,  
Universitatea de Medicină  
și Farmacie „Carol Davila”  
București

Autor de corespondență:  
Octavian Munteanu  
e-mail: octav\_munteanu@  
yahoo.com

## Abstract

Non-invasive prenatal tests are tests which examine fetal DNA in maternal blood in order to establish the risk of fetal aneuploidies, analyzing chromosomes 21, 18 and 13 and the sex chromosomes X and Y. The tests were validated in women with singleton or twin pregnancies with the age of at least 10 weeks of gestation, and cannot exclude fetal chromosomal anomalies. In pregnancies with more than one fetus, they will not provide information about the sex chromosomes. This analysis does not replace chorionic villus biopsy, cordocentesis or amniocentesis. The objective of this paper is to analyze the applicability of sequencing chromosome selective cfDNA during non-invasive tests in order to establish an algorithm that includes the lower fractions from some viable twin pregnancy or “vanishing twin syndrome”.

**Keywords:** non-invasive prenatal tests, twin pregnancies, management

## Rezumat

Testele neinvazive prenatale sunt teste care analizează ADN-ul fetal din sângele matern și stabilesc riscul de aneuploidii fetale, analizând cromozomii 21, 18 și 13, precum și cromozomii sexuali X și Y. Testele au fost validate la gravidele cu sarcină unică și gemelară cu cel puțin 10 săptămâni de gestație și nu pot exclude toate anomaliile cromozomiale fetale. În cazul sarcinilor cu mai mult de un făt nu se vor furniza informații despre cromozomii de sex. Aceste analize nu înlocuiesc biopsia de vilozități coriale, cordocenteza sau amniocenteza. Obiectivul acestei lucrări este acela de a analiza aplicabilitatea secvențierii cfDNA cromozomiale selective prin prelevări neinvazive și stabilirea unui algoritmul care să includă și fracțiile inferioare provenite de la unele sarcini gemelare viabile sau cu un „gemăn dispărut”.

**Cuvinte-cheie:** test prenatal neinvaziv, sarcină gemelară, management

## Introducere

Deja au trecut câțiva ani de când testul prenatal neinvaziv, folosind sângele matern, a câștigat din ce în ce mai multă popularitate, fiind agreat atât de societățile de specialitate implicate, cât și de pacientele selecționate, în egală măsură.

Trisomia 21 (sindromul Down) este cea mai cunoscută și având cea mai mare speranță de viață dintre toate aneuploidiile regăsite la nou-născuții vii, aceștia fiind caracterizați de o capacitate deficitară de învățare, IQ-ul mediu nedepășind 50, defecte viscerale (în special cardiace și intestinale), statură mică, risc de infecții și defecte la nivelul analizatorului auditiv<sup>(1,2)</sup>. Acești indivizi prezintă o mortalitate și o morbiditate semnificativ crescute, cu un impact atât psihosocial, cât și financiar la nivelul comunității, dar mai ales al familiilor din care provin.

Dacă prevalența sindromului Down este de 1 la puțin peste 600<sup>(3)</sup>, în populația generală aceasta variază între 1 la 1340 la vârsta de 25 de ani până la 1 la 353 la 35 de ani și atingând 1 la 35 la gravidele de peste 45 de ani<sup>(4,5)</sup>.

Trisomia 18 (sindromul Edwards) se caracterizează prin malformații fetale pluriorganice, cerebrale, cardiace, de cele mai multe ori grave, care determină în majoritatea cazurilor avorturi spontane sau deces peripartum.

De cele mai multe ori, supraviețuitorii se confruntă cu dizabilități intelectuale profunde, cu o dezvoltare inadecvată și mor în primul an de viață<sup>(5)</sup>.

Având cam același tablou clinic ca feții cu trisomia 18, și cei diagnosticați cu trisomia 13 sau sindromul Patau au o rată foarte mică de naștere la termen, iar majoritatea celor născuți vii mor în primul an de viață<sup>(5)</sup>.

Anomaliile cromozomiale legate de determinismul sexual se regăsesc la aproximativ 1 din 400 de nou-născuți vii, reprezentând o pondere mai frecventă decât a aneuploidiei autozomale<sup>(6)</sup>. Cu excepția monosomiei X (sindromul Turner), care poate fi detectată la screeningul prenatal ecografic prin evidențierea higronei chistice sau cu un defect cardiac sugestiv pentru un defect genetic, celelalte triploidii, cum sunt sindromul Klinefelter (XXY) sau sindromul XYY, nu au un fenotip detectabil prin ultrasunete sau prin screeningul seric, singurele metode de diagnostic fiind cele invazive sau de screening neinvaziv din acidul dezoxiribonucleic (ADN) liber circulant din sângele matern. De exemplu, 90% dintre femeile care poartă un cromozom X suplimentar și nu conștientizează această anomalie<sup>(7)</sup>, dar sunt fertile, pot detecta acest lucru odată cu testarea neinvazivă a ADN-ului circulant fetal din sângele periferic al acestora, când ajung să poarte o sarcină susceptibilă pentru o anomalie cromozomială.

## Metoda de screening

La începutul anilor 2000, screeningul aneuploidiei se baza pe măsurarea translučenței nucleare (NT) în primul trimestru de sarcină, coroborată cu încărcarea plasmatică a proteinei placentare-A (PAPP-A) și împreună cu concentrația serică a altei proteine, numită gonadotropină corionică umană (hCG), ceea ce oferea o sensibilitate și o specificitate în jurul procentului de 60%<sup>(8)</sup>; în ultima vreme, protocoalele de screening prenatal însumează markeri noi atât ultrasonografici, cât și a două probe de sânge în primul și, respectiv, în al doilea trimestru de sarcină, cu sau fără NT, îmbunătățind remarcabil performanțele, astfel încât screeningul poate detecta până la nouă din zece cazuri de sindrom Down<sup>(9)</sup>. Randalamentul confirmării diagnosticului prin tehnici invazive a crescut de la 4% la 6%<sup>(10)</sup>.

Până relativ recent, pentru oricare gravidă la care se suspecta un risc genetic crescut de aneuploidie, singura sursă de ADN fetal necesar pentru a stabili un diagnostic genetic prenatal era reprezentată de procedurile invazive, precum biopsia de vilozități coriale, amniocenteza sau cordocenteza. Aceste proceduri invazive implică anumite riscuri, atât materne, cât și fetale, mergând până la pierderea sarcinii, lucru de neacceptat mai ales în cazul unor sarcini obținute cu mari sacrificii și implicații complexe atât medicale, cât și psihoemoționale.

Dacă, odată cu standardizarea metodei, pentru sarcinile monofetale protocoalele de lucru sunt mai simple, când avem de realizat o testare neinvazivă din sângele matern (NIPT), folosind acid dezoxiribonucleic fetal liber (cfDNA) din sângele periferic matern, situația este mai complexă, pentru că trebuie să avem în vedere câteva:

### A) Criterii generale<sup>(11)</sup>:

- Vârsta maternă >35 de ani.
- Rezultatele ultrasonografice fetale care să indice un risc crescut de aneuploidie, dintre acestea cele mai cunoscute fiind: lipsa osului nazal, translučența nucală >3,5 mm sau valori anormale la măsurarea Doppler spectrală a ductului venos.

- În antecedente, istoric de sarcini cu trisomii.

- Orice rezultat pozitiv al screeningului pentru aneuploidie, inclusiv în primul trimestru, la testul biochimic combinat sau secvențial ori la rezultatele  $\alpha$ -testului din al doilea trimestru, care integrează valorile alfa fetoproteinei (AFP), estradiolului (UE3) și HCG<sup>(12)</sup>.

- Translocatie robertsoniană parentală asociată cu un risc crescut de trisomie fetală 13 sau trisomie 21.

- Follow-up test de confirmare pentru femeile cu un rezultat pozitiv în primul trimestru sau test de screening pentru al doilea trimestru.

### B) Criterii pentru sarcina gemelară sau multiplă<sup>(11)</sup>:

- Sarcină monozigotă sau dizigotă.

- Gemeni obținuți natural sau prin tehnici de reproducere umană asistată.

- Cei doi/mai mulți feți să fie în evoluție<sup>(13)</sup>.

În cazul sarcinilor gemelare, feții pot fi monoziгоți, atunci când bagajul genetic al celor doi este identic, și prin urmare sunt afectați în egală măsură, sau dizigoți, când numai unul dintre feți are risc mai mare de aneuploidie. Este demonstrat deja, prin studii, că în cazul gemenilor dizigoți fiecare geamă contribuie diferit cu cfDNA în circulația maternală, concentrația putând să difere până la aproape de două ori<sup>(14,15)</sup>.

Prin urmare, există riscul ca într-o sarcină gemelară cu dizigoți, cantitatea de cfDNA să fie sub 4%, reprezentând limita inferioară pentru validarea testelor NIPT pentru geamănul afectat de aneuploidie, dar pragul de „satisfăcător pentru evaluare” să fie asigurat de celălalt făt, rezultatul final putând să iasă discordant cu realitatea, printr-un risc scăzut eronat pentru aneuploidie. Pentru a nu se ajunge la rezultate fals-pozitive „liniștitoare” pentru sarcinile gemelare cu fracție inferioară a cfDNA, cele mai multe laboratoare recomandă tehnici invazive<sup>(16)</sup>.

Plecând de la aceste limitări, am decis să analizăm dacă există discrepanțe între rezultatul unui test prenatal neinvaziv cu cel obținut prin biopsie de vilozități coriale la o gravidă dispensarizată în Clinica de Obstetrică-Ginecologie a Spitalului Universitar de Urgență București.

## Prezentare de caz

Raportăm cazul unei gravide în vârstă de 39 de ani, de rasă caucaziană, cu înălțimea de 162 cm, greutate de 58 kg, nefumătoare, citologie cervicală recent efectuată cu rezultat în limite normale și fără antecedente personale patologice cunoscute.

Pacienta a născut pe cale vaginală, la vârsta de 33 de ani, un făt la termen, clinic sănătos, însă la 38 de ani a expulzat în săptămâna a 24-a de sarcină un făt de 650 de grame, care a decedat la trei zile post-partum, din cauza complicațiilor prematurității extreme. Pacienta infirmă existența unor cazuri familiale de boli genetice.

Partenerul pacientei, în vârstă de 41 de ani, fumător (10 pachete/an), este aparent sănătos și fără boli cronice cunoscute.

Primit:  
15.01.2017  
Acceptat:  
20.02.2017

Pacienta a obținut spontan sarcina actuală și a fost luată în evidență în săptămâna a șasea. La examinarea ultrasonografică endovaginală, la 6 săptămâni și 4 zile de amenoree, am constatat prezența intrauterină a doi saci gestaționali (SG), fiecare conținând câte o veziculă vitelină (VV), dar fără ecou embrionar sau activitate cardiacă, și o mică imagine sugestivă pentru hematoma periovular situat supracervical. Investigațiile paraclinice uzuale erau în limite normale.

Pacienta a primit tratament progestativ și tocolitic și a revenit pentru reevaluare ultrasonografică la distanță de 10 zile de la precedentă expunere, când s-au detectat doi saci gestaționali, aparent independenți, fiind considerați gemeni dizigoți, fiecare cu câte o veziculă vitelină, dar numai într-un singur caz s-a vizualizat embrion cu o lungime craniocaudală (CRL) corespunzătoare pentru 8 săptămâni, prezentând un ritm cardiac de 176 de bătăi pe minut ritmice; în celălalt SG se regăsea schița unui embrion la care s-a putut măsura CRL corespunzător pentru 7 săptămâni și 2 zile de gestație, dar lipsind activitatea cardiacă.

Având în vedere atât statusul obstetrical, cât și vârsta pacientei, aceasta a fost consiliată genetic și psihologic și a primit recomandarea de screening pentru aneuploidii fetale prin NIPT sau testare invazivă prin CVS și evaluare ultrasonografică în serviciul de medicină materno-fetală.

Din cauza situației socioeconomice și având în vedere că serviciul public de asistență medicală preventivă nu finanțează aceste testări, pacienta a optat pentru biopsia de vilozități coriale la vârsta gestațională de 14 săptămâni și 4 zile (figura 1), iar proba biologică s-a lucrat într-un serviciu privat acreditat și avizat în acest sens. Celulele tisulare au fost cultivate în două culturi independente, iar pregătirea metafazelor a fost efectuată după protocoale standardizate. Cromozomii extrași au fost bandați prin tehnica de bandare G (RHG) cu scor >4. Analiza citogenetică a fost realizată de doi observatori, folosind Caryosystems Image Analysis Software. Au fost puse în evidență mai multe metafaze,

dintre care 20 au fost analizate, iar dintre acestea 10 au fost cariotipate, de unde a rezultat un cariotip feminin normal.

Având aceste date ale unei sarcini gemelare dizigotice cu un embrion oprit în evoluție înaintea evidențierii ultrasonografice a activității cardiace fetale, dar și faptul că cfDNA din sângele matern dispare la 1-2 săptămâni după naștere sau, în cazul nostru, după oprirea în evoluție a unuia dintre gemeni, am solicitat sprijinul unui sponsor și, cu acordul și consimțământul informat al pacientei, am efectuat testarea neinvazivă din sângele periferic al acesteia, având ca scop observarea concordanței datelor de screening cu cele de diagnostic pus prin CVS. NIPT s-a efectuat la 15 săptămâni și 2 zile de gestație, prin recoltarea unei probe de sânge matern, care a fost analizată pe platforma Harmony a laboratorului Ariosa Diagnostics.

Rezultatul a fost în deplină concordanță cu cel din CVS, din acest studiu de caz concluzionând că prezența „geamănului dispărut” nu a modificat rezultatele NIPT (figura 2).

## Discuții și concluzii

Majoritatea laboratoarelor care realizează screening NIPT nu pot realiza o separare fidelă a ADN-ului circulant și evită să analizeze sângele provenit de la o sarcină gemelară la care un făt n-a mai evoluat<sup>(17)</sup>.

În literatură au fost raportate cazuri în care, prin NIPT, secvențierea ADN-ului a raportat cromozomii sexuali ca fiind XY, iar la naștere, după analiza cariotipului fetal, rezultatul a fost de XX<sup>(18)</sup>, precum și rezultate fals-pozitive sau fals-negative care vizau aneuploidiile. Discuția a fost că eroarea s-a produs tocmai prin prezența geamănului oprit în evoluție și analiza eronată a secvenței cfDNA a acestuia<sup>(19)</sup>.

Apreciind domeniul screeningului și cel al diagnosticului prenatal raportat la sarcinile gemelare ca fiind foarte interesante și existând încă multe necunoscute, se ridică încă multe provocări pentru descoperirea sau perfecționarea unor noi tehnici de diagnostic, prioritar fiind cele neinvazive.

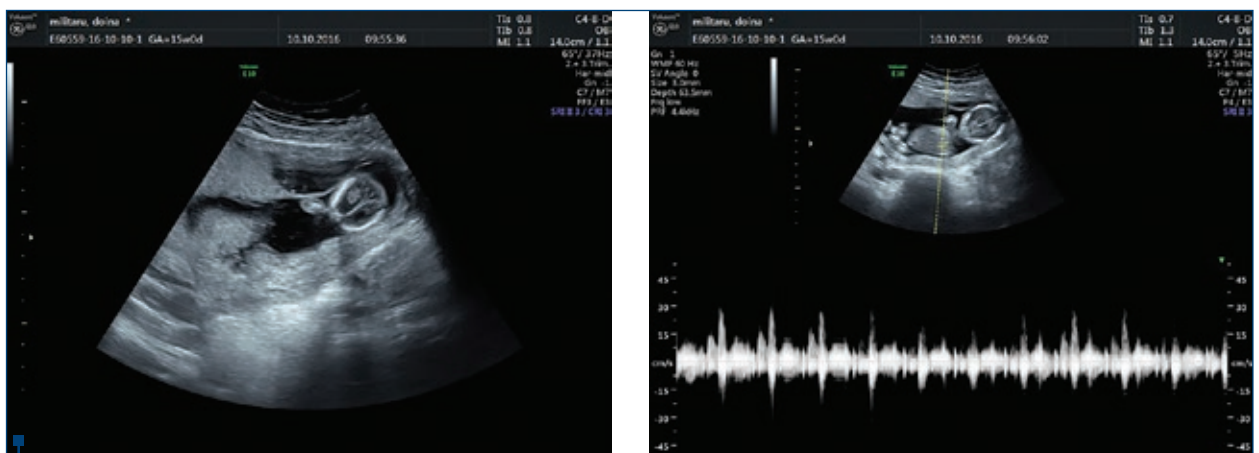


Figura 1. Evaluarea ecografică a pacientei înainte de efectuarea biopsiei de vilozități coriale - se remarcă fătul în evoluție și sacul ratat al geamănului oprit din evoluție

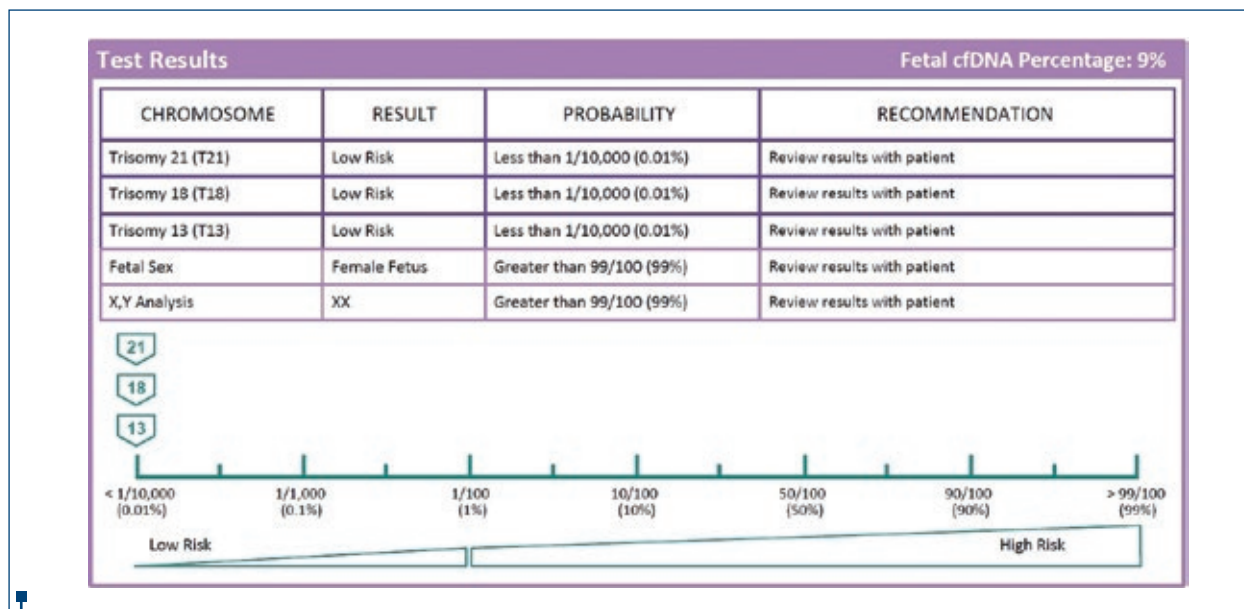


Figura 2. Rezultatul testului prenatal neinvaziv analizat pe platforma Harmony

În momentul de față, un rol foarte important și o atenție deosebită presupun cunoașterea cu exactitate a corionicității, precum și a zigozității sarcinilor ge-

melare, pentru a putea lua deciziile cele mai bune în privința screeningului și a diagnosticului prenatal al anomaliilor cromozomiale. ■

## Bibliografie

- US Department of Health and Human Services Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention. Assisted reproductive technology and succes rates: National summary and fertility clinic reports. Atlanta, GA: CDC; 2006.
- Vanneste E, Voet T, Le Caiganc C, Ampe M, Konings P, Melotte C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009;15:577-83.
- Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft WB, Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Hum Reprod* 2008;23:2596-608.
- Resta RG. Changing demographics of advanced maternal age (AMA) and the impact on the predicted incidence of Down syndrome in the United States: Implications for prenatal screening and genetic counseling. *Am J Med Genet A*, 2005;133A(1):31-6.
- Morris JK, Mutton DE, Alberman E. Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down's syndrome. *J Med Screen*. 2002;9(1):2-6.
- Rodeck CH. *Fetal Medicine*, 2<sup>nd</sup> Edition: Basic Science and Clinical Practice. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2009.
- McCullough RM, Almasri EA, Guan X, Geis JA, Hicks SC, Mazloom AR, Deciu C, Oeth P, Bombard AT, Paxton B, Dharajiya N, Saldivar JS. Noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy testing - clinical experience: 100,000 clinical samples. *PLoS One*. 2014;7:9(10): e109173.
- Koch MS, Charles M Strom, Matthew Rabinowitz, Peter Benn. Clinical experience and follow-up with large scale single nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal aneuploidy testing. *Amn J Obstet Gynecol*. 2014;211(5):527.e1-527.
- Benn PA, Egan JF, Fang M, Smith-Bindman R. Changes in the utilization of prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol* 2004;103:1255-60.
- Cuckle H, Benn P. Multianalyte maternal serum screening for chromosomal defects. In *Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment* (6th edn), Milunsky A, Milunsky JM (eds). Wiley-Blackwell, Chichester, UK, 2010;771-818.
- Syngelaki A, Chelemen T, Dagklis T, Allan L, Nicolaides KH. Challenges in the diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities at 11-13 weeks. *Prenat Diagn* 2011;31:90-102.
- American College of Obstetricians and Gynecologists and the Society for Maternal-Fetal Medicine. Committee Opinion No. 545: Non-invasive prenatal testing for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol* 2012;120:1532-4
- Berceanu C., Cirstoiu M.M., Brătîlă E., Vasile L., Gheorman V., Berceanu S., Vlădăreanu S. The vanishing twin syndrome. An update. *Ginecologia.ro*, 2015;3(8):12-6.
- Spencer K. Aneuploidy screening in the first trimester. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007;145C:18-32.
- Qu JZ, Leung TY, Jiang P, Liao GJ, Cheng YK, Sun H, Chiu RW, Chan KC, Lo YM: Noninvasive prenatal determination of twin zygosity by maternal plasma DNA analysis. *Clin Chem*, 2013;59:427-35.
- Leung TY, Qu JZ, Liao GJ, Jiang P, Cheng YK, Chan KC, Chiu RW, Lo YM: Noninvasive twin zygosity assessment and aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Prenat Diagn* 2013;33:675-81.
- Struble CA, Syngelaki A, Oliphant A, Song K, Nicolaides KH: Fetal fraction estimate in twin pregnancies using directed cell-free DNA analysis. *Fetal Diagn Ther*, 2014;35(3):199-203.
- Vanished Twins and Misdiagnosed Sex: A Case Report with Implications in Prenatal Counseling Using Noninvasive Cell-Free DNA Screening. <http://jabfm.org/content/29/3/411.full>
- Vlădăreanu S, Boianțiu A, Mehedițu C, Berceanu C, Popescu S. Vanishing twin syndrome and its perinatal consequences - literature review. *Ginecologia.ro*, 2017;5(15):58-60.