

Testarea genetică prenatală neinvazivă prin AND liber fetal - metodă de screening pentru sarcinile cu risc înalt de malformații fetale

Prenatal genetic testing through NIPT - screening method in high risk pregnancies for fetal malformations

Viorica Tudor¹,
Octavia Velicu²,
Mihai Mitran^{1,2},
Simona
Vlădăreanu^{1,3},
Alexandru
Filipescu^{1,4},
Elvira Brătilă^{1,2},
Emilia Severin¹

1. Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București
2. Spitalul Clinic de Obstetrică-Ginecologie „Prof. Dr. Panait Sîrbu”, București
3. Spitalul Clinic de Urgență „Elias” București, Departamentul de Neonatologie
4. Spitalul Clinic de Urgență „Elias” București, Departamentul de Obstetrică-Ginecologie

Autor de corespondență:
Dr. Viorica Tudor
e-mail: tudorviorica_med@yahoo.com

Abstract

The field of non-invasive prenatal screening and diagnosis appears to be revolutionized by the introduction of cell free fetal DNA-based tests conducted on blood samples collected from pregnant women. Accompanied by the public release of this new method of prenatal screening, 2011-2016 period brought about a variety of studies, concerned with the evaluation of technologies used - singular nucleotide polymorphism and massive genomic parallel sequencing, with the sole purpose of increasing its specificity and sensitivity. The importance of reviewing the latest studies conducted on non-invasive prenatal testing is enforced by the need of a standardized protocol for the application of the method in the safest way possible. This paper is a review of articles published worldwide during 2012-2016, obtained after an extensive search of databases such as PubMed, UpToDate, The Cochrane Library, Springer Link.

Keywords: non-invasive prenatal testing, cell free fetal DNA, prenatal screening

Rezumat

Domeniul screeningului și al diagnosticului genetic prenatal neinvaziv pare a fi revoluționat de introducerea testării ADN-ului fetal liber din sângele matern. Începând cu 2011, odată cu introducerea în practica clinică a acestei metode de screening prenatal, numeroase studii s-au axat pe cercetarea folosirii tehnicilor de secvențiere genomică paralelă masivă și polimorfism singular de nucleotide, cu scopul de creștere a specificității și sensibilității sale. Necesitatea unei lucrări de revizuire a ultimelor studii realizate pe testarea prenatală neinvazivă prin ADN liber fetal este susținută de nevoia de standardizare a protocoalelor de management al acestei metode, pentru o cât mai bună înțelegere și aplicare a metodei. Lucrarea de față reprezintă un review de articole publicate în perioada 2012-2016 la nivel internațional, rezultate în urma unei căutări extensive în cadrul unor baze de date, precum PubMed, UpToDate, The Cochrane Library, Springer Link.
Cuvinte-cheie: testare prenatală neinvazivă, ADN fetal liber, screening prenatal

Introducere

Începând cu 2011, o nouă metodă de screening prenatal a fost lansată pe piață și pare a schimba rapid paradigmele testării prenatale. Testarea prenatală neinvazivă (NIPT) oferă un pas intermediar între testul combinat și metodele de diagnostic invazive. NIPT este bazat pe analiza ADN-ului fetal liber circulant (cffDNA) prezent în sângele matern. La prima vedere, NIPT este mai specific, cu o rată mai mică de rezultate fals-pozitive în comparație cu testul combinat, dar nu poate încă să fie introdus în categoria de test diagnostic.

În 1997 a fost prima oară demonstrată prezența ADN-ului fetal liber circulant în sângele matern⁽¹⁾, în 2001 s-a determinat prima oară Rh-ul fetal, urmat, în 2006, de sexul fetal. Metoda a fost lansată pe piața largă în 2011 și a cunoscut o creștere exponențială de la 100000 de teste efectuate în 2012 la 1000000 în 2015.

ADN-ul liber fetal

Sursa primară de ADN fetal liber provine din apoptoza celulelor placentare - sincițiotrofoblast. Totodată, apoptoza eritrocitelor fetale este și ea o sursă de ADN liber fetal, acesta putând trece bariera fetoplacentară și ajunge în circulația maternă⁽²⁾. ADN-ul circulant, indiferent de origine, este foarte fragmentat, fiecare fragment având între 50 și 200 de baze, cu o mărime medie de 146 de baze^(3,4).

Tehnicile testării prenatale neinvazive

Așa cum a fost menționat mai devreme, cantitatea totală de ADN liber este mică (mai puțin de 1 μg în 20 ml de sânge). Până la momentul actual nu s-a descoperit o metodă fiabilă de separare a ADN-ului liber fetal de cel matern, de aici provenind și una dintre limitările testului și probabil diferența între metoda de screening și diagnostic atribuită acestuia⁽⁵⁾. Astfel, detectarea anomaliilor

Primit:
23.02.2017
Acceptat:
19.03.2017

din ADN-ul liber se poate realiza doar după amplificarea printr-o reacție de polimerizare în lanț (PCR) și analizarea întregului complement. Există două abordări diferite ale acestui concept: cantitativă (totală sau țintită) și calitativă (polimorfism singular de nucleotide - SNP)^(6,7).

■ Secvențierea masivă paralelă cantitativă totală (shotgun) - MPSS

MPSS este o tehnică bazată pe secvențierea de nouă generație (NGS), care analizează toți cromozomii. Astfel, zeci de milioane de fragmente de ADN sunt secvențiate rapid și simultan, acest lucru fiind vital pentru posibilitatea implementării metodei, întrucât cu cât crește numărul de analizări necesare, cu atât crește costul⁽⁸⁾.

După un prim pas de amplificare și secvențiere a complementului de ADN liber fetal și matern, originea cromozomului este obținută prin compararea fiecărui fragment cu genomul uman. Următorul pas este compararea densității fiecărui cromozom descoperit cu densitatea medie cunoscută a acestuia (analiza scorului z). Un făt trisomic deține cu 50% mai mult material genetic cu originea în cromozomul afectat, astfel cantitatea descoperită comparată cu cantitatea unui făt euploid o să fie mai mare și va returna un rezultat pozitiv pentru o sarcină cu risc crescut de aneuploidie⁽⁶⁾.

Principalul punct slab al MPSS reiese din însăși tehnica folosită. Fiind o metodă de numărare și comparare cantitativă, aceasta este dependentă de fracția fetală de ADN liber. Vârsta sarcinii și indicele de masă corporală crescut matern rezultă în fracții fetale mici și un număr foarte mare de analizări necesare pentru un rezultat relevant.

■ Secvențierea masivă paralelă cantitativă țintită (targeted)

Secvențierea țintită generează amplificarea și secvențierea selectivă a regiunilor genomice, spre deosebire de MPSS, unde citirile sunt aleatorii din toți cromozomii. Astfel, rezolvă problema MPSS a necesității unui număr foarte mare de analizări, întrucât aproape orice citire returnează un rezultat util⁽⁹⁾. Secvențierea țintită permite axarea analizei pe cromozomii importanți clinic, cu precădere 21, 13, 18, X și Y.

■ Polimorfismul singular de nucleotide (SNP)

Includerea informației genotipice, în general SNP-uri, generează o analiză mult mai complexă a ADN-ului liber fetal, rezultând informații mult mai specifice, spre deosebire de metodele cantitative. Secvențierea bazată pe SNP poate fi definită ca o metodă calitativă de analiză care poate să identifice contribuția maternă și fetală a ADN-ului liber⁽¹⁰⁾. Tehnica calitativă oferă, de asemenea, posibilitatea reconstrucției haplotipurilor cu identificarea triploidiei și permite folosirea de modele sofisticate, capabile de a marca probele care nu dețin suficiente date pentru a returna un rezultat și necesită o nouă recoltare.

Există până la momentul actual două metode care se bazează pe SNP:

■ Rația alelelor

Această primă metodă genotipică amplifică și secvențiază SNP-uri, numărând alelele materne și fetale și generând rația dintre un cromozom de interes și cromozomul de referință⁽¹¹⁾. Necesitatea unui cromozom de referință face ca această metodă să nu poată, la momentul actual, să

detecteze triploidii. Ea nu a fost validată de niciun studiu clinic și nu este încă introdusă pe piață.

■ Analiza genotipică

A doua metodă folosește amplificarea țintită a SNP-urilor, urmată de NGS și o analiză informatică, pentru identificarea sursei cromozomului fetal studiat⁽¹²⁾. Poate părea la prima vedere o metodă foarte asemănătoare cu MPSS, dar diferențele provin din țintirea nu a unor zone nonpolimorfice, ci a unor SNP-uri, și astfel metoda este mai mult analitică decât cantitativă.

Datorită faptului că metoda folosește o analiză a originii și cantității alelice, aceasta nu necesită un cromozom de referință și nu este supusă variațiilor datorate amplificării.

Este până la momentul actual cea mai specifică metodă, cu rate de 100% de depistare a aneuploidiilor (trisomia 21,13,18) și 0% rezultate fals pozitive. Totodată, este singura capabilă să detecteze triploidii^(6,19).

Sensibilitatea și specificitatea testării prenatale neinvazive

În cel mai mare review de literatură și metaanaliză realizat pe NIPT, publicat în 2016 de *BMJ Open*, 41, 37 și 30 de studii au fost introduse bazate pe sindromul Down, respectiv Edwards și Patau. Sensibilitatea generală a fost calculată la 99,3% (95% - 99,6%) pentru Down, 97,4% (95,8% - 98,4%) pentru Edwards și 97,4% (86,1% - 99,6%) pentru sindromul Patau. Sensibilitatea a fost mai mică în cazul sarcinilor multiple, redusă cu 9% pentru Down, 28% pentru Edwards și cu 22% pentru Patau⁽¹³⁾. Conform articolului, sensibilitatea a fost mai scăzută pe testările efectuate în primul trimestru, astfel Pergament et al. au descoperit că rata de rezultate neconcludente la mai puțin de 9 săptămâni este de aproximativ 27,4%, între 9 și 9,6 săptămâni - 12% și la mai mult de 10 săptămâni de 5,9%⁽¹⁴⁾. Atât Pergament et al., cât și Norton et al. au concluzionat că prevalența aneuploidiilor în grupurile fără rezultat este mai mare decât în cohorta generală (10,9%, în comparație cu 0,4%)^(14,15,18).

Specificitatea calculată a fost 99,9% (99,9% - 100%) pentru toate trei trisomiile. Aceasta a fost însă mai scăzută în studiile pe sarcini cu risc scăzut de malformații fetale, astfel, la un număr de 100000 de testări pe populație neselectată anterior, neașteptăm la o detecție prin NIPT a 417, 89 și 40 de cazuri de Down, Edwards, respectiv Patau, cu 94, 154, respectiv 42 de rezultate fals-pozitive. De aici și bariera între testul de screening și testul de diagnostic și necesitatea reconfirmării oricărui test pozitiv.

Rata de rezultate neconcludente a fost între 0% și 12,7% și, din 5789 de sarcini la care s-a refăcut testarea, un număr de 803 (13,9%) au prezentat un rezultat neconcludent și a doua oară. La calcularea sensibilității și specificității bazate și pe rezultatele neconcludente s-a observat o scădere a sensibilității cu 1,7% pentru sindromul Down, 1,6% pentru Edwards și 7,1% pentru Patau⁽¹³⁾.

Acuratețea testului nu a fost influențată de tehnica de testare folosită (MPSS sau SNP).

Indicațiile testării prenatale neinvazive

În septembrie 2015, Colegiul American de Obstetrică-Ginecologie (ACOG) a formulat o serie de indicații și

Tabelul 1 Comparație între principalele teste neinvazive

	Panorama (Natera)	Nifty (BGI)	Harmony (Ariosa)	Verifi (Verinata)	Materni T21 plus (Sequenom)
Trisomii testate	13,18,21, cromozomi sexuali	13,18,21, cromozomi sexuali	13,18,21	13,18,21, cromozomi sexuali	13,18,21, cromozomi sexuali
Monosomii testate		X			
Tehnica genetică folosită	SNP	MPS	Secvențiere cromozomială selectivă	MPS	MPS
Sensibilitate	92-99%	99.5%	80-99%	87-99%	92-99%
Specificitate	100%	99.5%	99%	100%	99%
Vârsta gestațională minimă (săptămâni)	9	10	10	10	10

recomandări cu privire la NIPT, venind astfel în sprijinul medicilor pentru o mai bună informare a pacienților și o folosire adecvată a acestei noi metode de screening prenatal.

■ NIPT este validat clinic și recomandat ca metodă principală de screening doar pentru sarcinile cu risc crescut, acestea fiind definite de ACOG ca:

1. vârsta maternă de 35 ani sau peste la nașterea fătului;
2. modificări ecografice relevante pentru o aneuploidie;
3. antecedente personale de sarcină cu malformații fetale;
4. screening pozitiv pentru aneuploidie (dublu, triplu test);
5. existența pe analiza genetică a părinților a unei translocării robertsoniene cu risc crescut pentru trisomie 21 sau 13.

■ NIPT nu trebuie folosit ca o metodă de selecție pentru studiul microdelețiilor.

■ NIPT nu este recomandat la sarcinile multiple.

■ Orice rezultat pozitiv trebuie verificat printr-o metodă de diagnostic, astfel încât nicio indicație de întrerupere a sarcinii nu va fi formulată fără o verificare prealabilă.

■ Orice testare care nu produce un răspuns sau acesta este nedeterminat ori neinterpretabil trebuie tratată ca un răspuns de risc crescut, iar pacienta trebuie să primească consiliere și îndrumare spre o metodă de diagnostic.

■ Pacienților trebuie să li se prezinte beneficiile, riscurile și limitările metodei⁽¹⁶⁾.

Limitările testării prenatale neinvazive

Utilizarea clinică a NIPT pentru screeningul malformațiilor fetale devine rapid o metodă larg apreciată și folosită. Totuși, metoda este, ca urmare a limitărilor pe

care le prezintă, considerată încă o metodă de screening, cu necesitatea îmbunătățirii tehnicilor de testare și a reducerii de costuri până la posibilitatea transformării în metodă de diagnostic.

■ NIPT nu prezintă aceeași sensibilitate pentru sarcinile multiple, din cauza imposibilității de selectare eficientă a originii ADN-ului.

■ NIPT este dependent de fracția fetală, cantitatea de ADN liber fetal din totalul de ADN liber. Frația fetală este cuprinsă, în general, între 1% și 13%, necesarul minim pentru testare fiind de 4%. Vârsta mică a sarcinii și greutatea mare a mamei sunt principalele cauze pentru o fracție fetală scăzută și deci un risc mai mare de rezultat neconcludent.

■ NIPT a fost validat clinic extins pe populațiile cu risc crescut de malformație fetală. În literatura de specialitate există însă foarte puține articole pe cohorte de populație generală sau cu risc scăzut (studii cuprinzând între 289 și 2049 de paciente), făcând astfel imposibilă calcularea unor sensibilități și specificități reale.

■ NIPT nu poate, la momentul actual, să redea un rezultat specific pe o anumită aneuploidie. Rezultatele sunt prezentate ca pozitiv/negativ sau ca risc de malformație - <1/10000 sau >99%. Totodată, originea aneuploidiei nu poate fi precizată. De exemplu, NIPT nu poate determina dacă sindromul Down este datorat prezenței unui extracromozom, a unei translocării robertsoniene sau a unui mozaicism înalt. Identificarea mecanismului de producere a aneuploidiei este importantă pentru consilierea genetică și riscul de recurență.

■ NIPT prevede un cariotip matern normal, deoarece un mozaicism matern sau prezența unei tumori solide materne poate influența rezultatul⁽¹⁷⁾. ■

Tabelul 2

Principalele diferențe și asemănări între testarea prenatală neinvazivă și metodele tradiționale de screening

	NIPT	Screeningul de trimestrul I	Screeningul de trimestrul II	Biopsie de vilozități coriale	Amniocenteza
Specificitate	91-99%	80-90%	65-81%	99,9%	99,9%
Vârsta gestațională (săptămâni)	10	11-14	15-20	11-13	16-22
Neinvazivitate				X	X
Risc de avort spontan	X	X	X	1%	0,5-1%
Țesut testat	Sânge	Sânge	Sânge	Placentă	Lichid amniotic
Timp până la validarea testului (zile)	10-14	1-2	1-2	14-21	14-21
Testare sex fetal		X	X		
Testare trisomii					
Testarea aneuploidiilor heterozomale		X	X		
Testarea microdelețiilor		X	X		

Bibliografie

- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-7.
- Sekizawa A, Samura O, Zhen DK, et al. Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat Diagn* 2000; 20:886.
- Chan KC, Zhang J, Hui AB, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004; 50:88.
- Yu SC, Chan KC, Zheng YW, Jiang P, Liao GJ, Sun H, et al. Sizebased molecular diagnostics using plasma DNA for non-invasive prenatal testing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:8583-8.
- Sparks AB, Struble CA, Wang ET, Song K, Oliphant A. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:319.
- Levy B, Norwitz E. Non-invasive prenatal aneuploidy testing: technologies and clinical implication. *MLO Med Lab Obs* 2013;45:8,10,12.
- Nepomnyashchaya YN, Artemov AV, Roumiantsev SA, Roumyantsev AG, Zhavoronkov A. Non-invasive prenatal diagnostics of aneuploidy using next-generation DNA sequencing technologies, and clinical considerations. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1141-54.
- Boon EM, Faas BH. Benefits and limitations of whole genome versus targeted approaches for non-invasive prenatal testing for fetal aneuploidies. *Prenat Diagn* 2013;33:563-8.
- Sparks AB, Wang ET, Struble CA, Barrett W, Stokowski R, McBride C, et al. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn* 2012;32:3-9.
- Liao GJ, Chan KC, Jiang P, Sun H, Leung TY, Chiu RW, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 by allelic ratio analysis using targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. *PLoS One* 2012;7:e38154.
- Liao GJ, Lun FM, Zheng YW, Chan KC, Leung TY, Lau TK, et al. Targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA permits efficient and unbiased detection of fetal alleles. *Clin Chem* 2011;57:92-101.
- Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, Demko Z, Banjevic M, Baner J, et al. Non-invasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn* 2012;32:1233-41.
- Sian Taylor-Phillips, Karoline Freeman, Julia Geppert, Adeola Agbebiyi, Olalekan A Uthman, Jason Madan, Angus Clarke, Siobhan Quenby, Aileen Clarke. Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2016;6:1 e010002.
- Pergament E, Cuckle H, Zimmermann B, et al. Single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening in a high-risk and low-risk cohort. *Obstet Gynecol* 2014;124(2 Pt 1):210-18.
- Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med* 2015;372:1589-97.
- Cell-free DNA screening for fetal aneuploidy. Committee Opinion No. 640. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol* 2015;126:e31-7.
- Lutgendorf MA, Stoll KA, Knutzen DM, Foglia LM. Non-invasive prenatal testing: limitations and unanswered questions. *Genet Med* 2014;16:281-5.
- Roșca I, Ristea A, Șerban M, Tocariu R, Tudor V, Nanea M, Mitran M. Congenital heart disease in Cornelia de Lange syndrome. Case report. *Revista Ginecologia.ro*, 2015;3(9):56-60.
- Comănescu CA, Cernea N, Siminel M, Comănescu MC, Barbu M, Comănescu MV. Prenatal diagnosis of Jarcho-Levin syndrome. *Revista Ginecologia.ro*, 2015;3(10):18-9.