



Screening nejčastějších aberací autozomů na podkladě volných fetálních fragmentů DNA v mateřské plazmě reprezentuje v současné době nejefektivnější vyhledávací test trizomie 21. Stále je nutné mít na paměti, že se jedná o test vyhledávací, ne diagnostický. V případě pozitivního nálezu je nutné nález potvrdit invazivní diagnostickou metodou. Testování mikrolečních syndromů pomocí NIPT má horší pozitivní prediktivní hodnotu vzhledem k nízké prevalenci onemocnění v populaci. Je vhodné dbát a myslet na mateřské faktory, které mohou mít vliv na výsledek testu. Mezi tyto faktory patří obezita matky, aktivní autoimunitní onemocnění, neoplastický proces a mozaicismus. Rychlý rozvoj technologií v této oblasti zcela jistě ovlivní směr a vývoj prenatální diagnostiky.

Neinvazivní prenatální test fetálních aneuploidií

doc. MUDr. LADISLAV KROFTA, CSc., MBA^{1,2,3}

¹ Ústav pro péči o matku a dítě, Podolské nábřeží 157, 147 00 Praha 4 – Podolí; ² 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy; ³ Katedra gynekologie a porodnictví IPVZ

Úvod

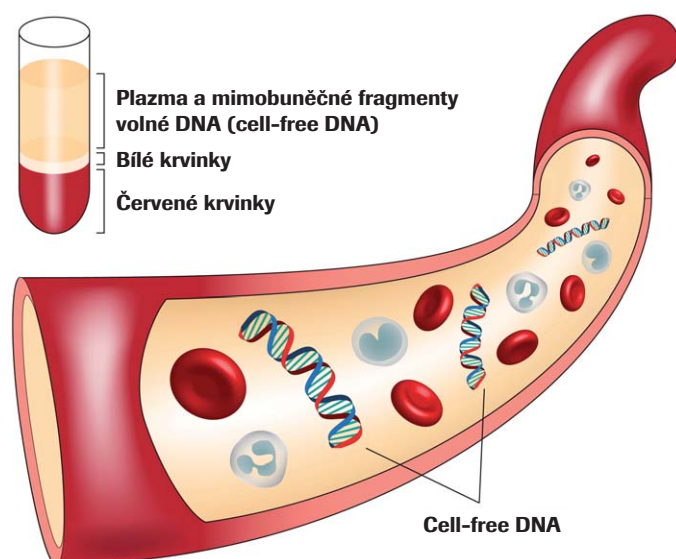
Fragmenty volné DNA a RNA jsou přítomny ve všech tělních tekutinách v určitém dynamickém stavu, který podléhá neustálé obměně. Jedná se o malé extracelulární fragmenty DNA cirkulující v krevním oběhu, pro které se v anglosaské odborné literatuře vžilo označení cell-free DNA (cfDNA). Technologický progres molekulárně genetických postupů posledních dvaceti let učinil tento jedinečný genetický materiál dostupným

pro zcela novou generaci krevních testů vhodných detekovat a monitorovat onemocnění.

V roce 1997 byly publikovány první práce o fetálním a placentárním původu cfDNA v mateřské cirkulaci.¹ V rámci péče o těhotnou ženu byla problematika fetální cfDNA a technologie DNA sekvenace velice rychle implementována do širší klinické praxe formou vyhledávacích testů prenatálního screeningu nejčastějších chromozomálních aberací. Jedná se o průlomovou technologii, která představuje revoluci v rámci screeningu vývojových vad.

Biologie cfDNA

Naprostá většina plazmatické cfDNA je uvolněna z hematopoetických buněk



▲ Obr. č. 1: Extracelulární fragmenty DNA cirkulující v krevním řečišti



v rámci normálního buněčného cyklu. Zároveň se na celkovém poolu cfDNA spolupodílí i řada jiných orgánů, příkladem jsou adipocyty tukové tkáně.² Za normálních okolností, není-li žena těhotná, reflektuje genomický profil plazmatické cfDNA individuální karyotyp jedince. Během těhotenství se placentární cfDNA rovněž uvolňuje do mateřské plazmy a tuto lze využít pro účely prenatalní diagnostiky. Tento typ DNA fragmentů pochází ze zevního cytotrofoblastu, do mateřské cirkulace se dostává prostřednictvím apoptózy.³ První průkaz fetoplacentární DNA v cirkulaci matky byl detekován pomocí specifických sekvencí Y chromozomu. CfDNA mající fetoplacentární původ je označována jako cffDNA (cell-free fetal DNA) a je detekována v cirkulaci matky od pátého gestačního týdne. Představuje přibližně 10–15 % celkového objemu cfDNA.⁴ Koncentrace cffDNA se zvyšují s gestačním týdnem a po ukončení těhotenství se koncentrace rychle snižuje až k absolutní eliminaci. CffDNA reprezentuje zdroj informací o probíhající graviditě a neperzistuje do dalšího těhotenství.⁵

Terminologie

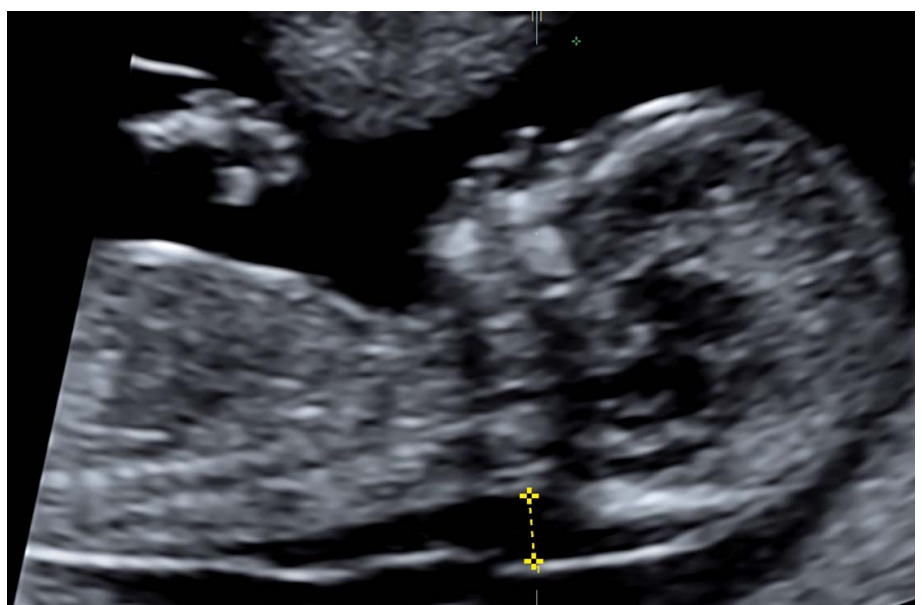
V souvislosti s volnou DNA v cirkulaci jsou často ne zcela správně používány některé termíny a označení. Pro klinickou praxi je však nutné znát jejich správný význam. Prenatální test založený na analýze cffDNA mateřské plazmy je označován v anglosaské odborné literatuře pomocí zkratky NIPT (noninvasive prenatal testing). Rovněž se lze v této souvislosti setkat možná s výhodnějším termínem, kterým je neinvazivní prenatální screening (NIPS – noninvasive prenatal screening). Toto označení přesněji vystihuje povahu testu a diferencuje jej od tradičních diagnostických a invazivních diagnostických intervencí hodnotících fetální karyotyp na základě analýzy buněk získaných biopsií choriových klků a odběru plodové

vody. Test fetálních aneuploidií pomocí cffDNA z mateřské plazmy nedosahuje přesnosti diagnostického vyšetření pro aneuploidii a v případě pozitivity vyžaduje provedení diagnostického vyšetření karyotypizací. Existují však i testy využívající cffDNA z mateřské plazmy, splňující požadavky diagnostického testu bez nutnosti verifikace invazivní intervencí. Jedná se o NIPD (noninvasive prenatal diagnosis), tyto jsou však primárně určeny pro detekci paternálních dědičných stavů plodu (unikátní fetální DNA sekvence, které nejsou obsaženy v mateřském genotypu).⁶

Tradiční screeningové metody fetálních aneuploidií

U fyziologicky se vyvíjejícího plodu lze koncem prvního trimestru gestace prokázat kumulaci tekutiny v podkoží oblasti fetálního krku a záhlaví. Sonografický náleznahromaděné tekutiny je v anglosaské odborné literatuře označován termínem nuchal translucency.⁷ V české odborné literatuře se pro nálezn kolekce tekutiny v oblasti záhlaví plodu pozorovaného koncem prvního trimestru vžil termín

šijové projasnění. U zdravých plodů se šíře šijového projasnění zvětšuje s hodnotou CRL. Maximální hodnota se pozoruje kolem 13. týdne a následně se šíře snižuje. Po 14. gestačním týdnem je parametr neměřitelný.^{8,9} Šijové projasnění reprezentuje nejvýznamnější sonografický minor marker I. trimestru těhotenství, který nevykazuje významnou vazbu na biochemické markery mateřského séra I. trimestru free β -hCG a PAPP-A. Závislost mezi parametrem projasnění šíje a biochemickými markery nebyla prokázána u plodů s trizomií 21 ani u plodů s normálním karyotypem. Vzhledem k neexistující závislosti sonografického markeru na biochemických markerech lze obě skupiny kombinovat a využít k individuální kalkulaci rizika chromozomální aberace (trizomie 21) v rámci screeningu. Kombinací hodnoty šijového projasnění, hodnot biochemických markerů a věku těhotné lze detekovat 90 % plodů s trizomií 21 při 5% falešné pozitivitě.¹⁰ Využitím algoritmu pro detekci trizomie 21 lze potvrdit 75 % procent plodů s trizomií 18 a 13. Kombinací s určením srdeční frekvence a zařazením specifického algoritmu pro trizomii 18 a 13 lze docílit 91% detekce trizomie 18 a 87% detekce trizomie



▲ Obr. č. 2: Plod s abnormální hodnotou šijového projasnění (NT 5 mm) u kterého byla následně prokázána abnormální chromozomální výbava (47+21). Šijové projasnění představuje nejvýznamnější sonografický minor marker I. trimestru gestace



13.¹¹ Společně se šijovým projasněním lze individuální riziko pro chromozomální aberaci dále upřesnit s využitím dalších sonografických markerů I. trimestru gestace. Jedná se o nosní kost, obličejový úhel a dva dopplerovské parametry zahrnující vyšetření fetálního venózního ductu a hodnocení toku na trikuspidální chlopní. Zatímco nosní kost a obličejový úhel mají vztah k chromozomálním aberacím, u dopplerovských parametrů lze v případě venózního ductu navíc prokázat vztah k přítomnosti závažné srdeční vady a riziku fetálního úmrtí. Odchylky toku na trikuspidální chlopní vykazují asociaci s aberacemi chromozomů a se srdečními vadami.

fetálního chromozomu 21 (dvě nebo tři kopie) prostřednictvím určení počtu fragmentů vycházejících z každého chromozomu. Počet fragmentů 21 chromozomu je následně porovnán a vztažen k referenčnímu počtu ostatních předpokládaných diploidních chromozomů. Následná statistická analýza určí, zda je přítomen vyšší počet chromozomu 21. K dispozici je několik NIPT platforem využitelných k detekci aneuploidii:

a) **Masivní paralelní sekvenace:** v anglosaské odborné literatuře je tento přístup označován jako MPS (massively parallel sequencing) nebo také náhodná celogenomová sekvenace (random whole genome sequencing).

MPS metoda počítá směrodatnou odchylku odhadovaného počtu každého chromozomu a stanoví z-skóre. Pokud je počet fragmentů 21 chromozomu v testovaném vzorku zvýšený o více než 3 směrodatné odchylky oproti normě, je riziko trizomie 21 chromozomu zvýšené.

b) **Chromozom selektivní cílená sekvenace:** v anglosaské odborné literatuře je tento přístup označován jako CSS (chromosome-selective sequencing). Na rozdíl od předešlé metody, kdy dochází k sekvenaci směsi DNA fragmentů plazmy, je u CSS plazma obohacena o preselektované fragmenty chromozomů 13, 18, 21 a pohlavních chromozomů. Proces obohacení je realizován prostřednictvím metody PCR (polymerase chain reaction), kdy dochází k amplifikaci segmentů DNA, které jsou jedinečné pro daný chromozom. Finální DNA směs, která je podrobena sekvenaci, je bohatá na fragmenty uvedených chromozomů a náklady a čas sekvenace jsou tímto redukovány. Individuální odhad rizika trizomií nebo aberací gonozomů je následně počítán s využitím parametrů populačního rizika (mateřský věk a gestační stáří), výsledku sekvenace a fetální frakce. Riziko 1 : 100 a více reprezentuje vysoce rizikovou skupinu.

c) **SNP sekvenace:** v anglosaské odborné literatuře je tento přístup označován jako single nucleotide polymorphism based sequencing (sekvenace na podkladě jednonukleotidového polymorfismu). U této metody je DNA extrahována z mateřské plazmy (obsahuje mateřskou cfDNA a cffDNA) a z mateřských leukocytů (pouze mateřská celulární DNA). Následně dochází k cílené amplifikaci ~ 20 000 SNPs chromozomů 21, 18, 13, X a Y. Poté je měřena variabilita na každém SNP lokusu. Fetální genotyp je odvozen na základě porovnání výsledku sekvenace mateřských leukocytů a plazmy. SNP sekvenace je



Využití NIPT pro detekci trizomie 21, 18 a 13

Základní princip NIPT u trizomie 21 je založen na detekci zvýšeného počtu DNA fragmentů 21 chromozomu v mateřské plazmě. Plod s trizomií 21 uvolňuje do mateřské cirkulace – v důsledku přítomnosti třetí kopie 21 chromozomu – více DNA fragmentů 21 chromozomu v porovnání s ostatními chromozomy.

DNA sekvenace cfDNA mateřské plazmy, obsahující směs mateřské a fetální DNA, umožňuje podrobný odhad dávky

Metoda umožní rychlou sekvenaci malých oddílů „reads“, náhodně vybraných DNA fragmentů na úrovni jednotlivých nukleotidů. Pouze část každého DNA fragmentu je sekvenována. Většinou se jedná o fragment o 36 párech bází. I tato malá část však postačí, aby byl fragment DNA mapován a umístěn na odpovídající chromozom původu.¹² I když uvedená metoda pracuje se směsí DNA fragmentů a nerozlišuje mezi fragmenty mateřskými a fetálními, byly v roce 2008 publikovány práce demonstrující identifikaci fetální trizomie.^{13,14}



schopna rozlišit mezi mateřským a fetálním zdrojem DNA a může rovněž obsahovat paternální zdroj genetické informace.¹⁵

Fetální frakce

Důležitým faktorem ovlivňujícím provedení NIPT je údaj o fetální frakci. Fetální frakce udává podíl cfDNA v celkové cfDNA mateřské plazmy.¹⁶ Pokud je podíl fetální frakce nízký, je detekce aneuploidie plodu obtížnější. Je celá řada biologických faktorů, které mají na podíl frakce vliv. Například zvýšená hmotnost těhotné ženy významně negativně souvisí s fetální frakcí. Až 7 % těhotných žen s hmotností nad 100 kg má fetální frakci < 4 %. Řada laboratoří udává podíl fetální frakce kolem 4 % jako hraniční pro analýzu. Vedle hmotnosti matky ovlivňuje hodnotu frakce gestační stáří a typ chromozomální aberace.

Senzitivita a specifita NIPT

Efektivita NIPT v rámci screeningu fetálních aneuploidií je vysoká a dosahuje lepších výsledků než standardní rutinně používané vyhledávací testy. Metaanalýza prací publikovaná v roce 2016 prokázala senzitivitu NIPT pro detekci trizomie 21; 99,3 %, trizomie 18; 97,4 % a trizomie 13; 97,4 %.¹⁷ V témže roce vydává Americká společnost lékařské genetiky a genomiky stanovisko, že lze na základě recentních dat informovat těhotné ženy o možnosti využití NIPT jako nejefektivnějším screeningovém testu pro trizomii 21, 18 a 13.¹⁸ Pro klinickou praxi je rovněž důležitý údaj o specifitě screeningového testu. Test s vysokou specifitou znamená málo falešně pozitivních výsledků, tento parametr vyhledávacího testu je žádoucí, jelikož klesá skupina žen indikovaných k invazivní intervenci pro pozitivitu (falešnou) testu. Specifita pro trizomii 21 je vysoká, 99,9 %. Celková kumulativní falešná pozitivita testu pro

aneuploidie 21, 18, 13 a aberace gonozomů je 0,72 %. Tedy přibližně 1 : 140. Tato relativně suboptimální hodnota jde na vrub X chromozomu a je způsobena nepoznaným mateřským mozaicismem a většinou podmíněnými ztrátami.¹⁹ Pozitivní prediktivní hodnota (PPH) je parametr charakterizující vyhledávací test. Udává pravděpodobnost onemocnění v případě, že je výsledek screeningového testu pozitivní. To znamená v případě NIPT, že výsledek vyšel v pásmu zvýšeného rizika. Senzitivita a specifita jsou charakteristiky testu vlastní, negativní a pozitivní prediktivní hodnota záleží na charakteru složení populace a frekvenci výskytu nemoci, kde je test prováděn. PPH bude nižší v nízkorizikové populaci žen a naopak. PPH je nižší pro chromozomy 13, 18 a pohlavní chromozomy v porovnání s chromozomem 21.

Iniciální studie a využití NIPT byly původně prováděny na vysoce rizikových populacích. Zde dosahovala PPH pro trizomii 21 80–90 %. Recentní data demonstují, že PPH NIPT předčí výsledky kombinovaného screeningu I. trimestru v neselektované populaci. V kohortě těhotných s průměrným věkem 30 let (riziko trizomie 1 : 700) je PPH NIPT pro trizomii 21 45,5 a pro trizomii 18 40 %. Z uvedeného je zřejmé, že pozitivní výsledek NIPT je nutno potvrdit diagnostickou metodou, zvláště pak, je-li ve hře varianta ukončení těhotenství. V případě, že pár obdrží informaci, že je výsledek NIPT testu negativní a riziko aneuploidie je nízké, je pravděpodobnost přítomnosti fetální aneuploidie velice nízká. I když je tato informace velice uklidňující, test 100% nevyločil přítomnost fetální aneuploidie. Pravděpodobnost falešně negativního testu pro trizomii 21 v rizikové populaci (1 : 100) je udávána v poměru 1 : 10 000. Abychom znali skutečnou falešnou negativitu testu, potřebujeme mít k dispozici rozsáhlé studie na neselektované populaci s větším počtem falešně negativních nálezů.

Selhání metody

Neschopnost předat páru výsledek NIPT testu je spojen s nízkou fetální frakcí, selháním laboratorní metody nebo administrativní chybou. V anglosaské odborné literatuře jsou tyto stavy označeny termínem „no call results“. Jednou z nejčastějších příčin nedostupnosti výsledků NIPT testu je nízká fetální frakce vyšetřovaného vzorku. Podmínkou pro získání výsledku je minimální přítomnost fetální frakce 2–4 %.²⁰ Fetální frakce je ovlivněna řadou biologických faktorů, jako je například váha matky, četnost těhotenství, gestační stáří. Typ NIPT testu má rovněž vliv na frekvenci jeho selhání. Nejvyšší pravděpodobnost selhání je uváděna u sekvenace na podkladě jednonukleotidového polymorfismu (6,4 %). Naopak nejnižší pravděpodobnost selhání je udávána u masivní paralelní sekvenace (1,6 %).²¹ Určité typy fetálních aneuploidií, mezi které patří například trizomie 13 a triploidie, bývají rovněž často spojeny se sníženou fetální frakcí a selháním metody. Proto je nutné počítat s možností přítomnosti fetální aneuploidie v případě, kdy není dostupný výsledek z důvodu nízké fetální frakce, a přizpůsobit tomu genetickou konzultaci. Zvýšená mateřská hmotnost rovněž snižuje fetální frakci a je nutno tímto směrem obězít těhotné informovat.

V roce 2016 publikovaná metaanalýza udává selhání testu mezi 0–12,7 %. V souboru 5 789 žen, které měly iniciální selhání testu a u nichž proběhl druhý odběr, jich 13,9 % mělo opět selhání metody.

Management v případě selhání metody by měl být veden v souladu s možnými příčinami, které k selhání mohou vést. Na prvním místě je třeba uvažovat o možnosti selhání v důsledku možné přítomnosti fetální aneuploidie. Možnosti, které máme k dispozici, jsou následující: a) kombinovaný screening I. trimestru, pokud se těhotná nachází ve vhodném období I. trimestru; b) podrobné



sonografické vyšetření se zaměřením na ultrazvukové markery chromozomální aberace; c) diagnostickou invazivní intervenci. Opakovat NIPT může být úspěšné až v 50 % případů, nicméně může nastat časová prodleva v případě opakovaného selhání metody. Těhotná se může dostat do vyšších gestačních týdnů, což v případě průkazu přítomnosti fetální aneuploidie a případného ukončení gravidity ve vyšším gestačním týdnu není žádoucí. Americká společnost lékařské genetiky a genomiky nedoporučuje NIPT v případě selhání opakovat.¹³

Klinická implementace

Existuje několik návrhů klinické implementace NIPT. V současné době se diskutuje kontingenční model provedení NIPT. Pacientkám, které podstoupily kombinovaný test v I. trimestru s výsledkem vysokého individuálního rizika, je nabídnuta invazivní diagnostická intervence. Ženám s intermediálním individuálním rizikem je nabídnut NIPT.²² Ve Velké Británii proběhly studie sledující efektivitu kontingenčního provedení NIPT u pacientek s kombinovaným testem I. trimestru nebo II. trimestru, u nichž bylo individuální riziko vyšší než

1 : 1000. Výsledky demonstrovaly zvýšenou detekci plodů s trizomií 21, nižší incidenci invazivních diagnostických intervencí a pokles těhotenských ztrát v důsledku komplikace v návaznosti na amniocentézu či biopsii choria, bez rozdílu finančních nákladů mezi skupinami.^{23,24} Na základě uvedených studií subjekt ve Velké Británii mající na starosti

screeningové programy doporučil NIPT u všech těhotných s individuálním rizikem vyšším než 1 : 150. Obdobný trend lze zaznamenat i v ostatních zemích Evropy (Nizozemsko) a Ameriky (Kanada). Americká společnost lékařské genetiky a genomiky navrhuje doporučení NIPT ženám s rizikem fetální aneuploidie.¹³

Další z možností, jak aplikovat NIPT, je jeho univerzální využití v kombinaci se sonografickým vyšetřením konce I. trimestru. Tato varianta je spojena s nejvyšší detekcí, ale i nejvyššími ekonomickými náklady.²⁵

Případy nevhodné k NIPT

NIPT představuje výborný screeningový test pro nejčastější aberace autozomů a gonozomů, ale není schopen podat tak detailní popis stavu jako invazivní diagnostika. Před NIPT by mělo být provedeno sonografické vyšetření mezi 11–14. gestačním týdnem. Až v 16 % případů rizikových pacientek lze detekovat nález popisující odlišnou dataci, vícečetnou

Před podstoupením NIPT je zapotřebí

- Poskytnout rodičům informaci o možnostech a dostupnosti vyhledávacích (screeningových) testů, test není povinný.
- Vysvětlit rozdíl mezi testem screeningovým a diagnostickým.
- Vysvětlit klinické znaky, důsledky a perspektivy onemocnění, které vyhledáváme.
- Jak a kdy test provést: odběr mateřské krve po 10. týdnu gestace.
- Přibližně vysvětlit technologii testu.
- Vysvětlit, v jakém formátu jsou předány výsledky: vysoké riziko; nízké riziko; výsledek nestanoven (no call).
- Vysvětlit výsledek testu: míra detekce; falešná pozitivita, falešná negativita; negativní prediktivní hodnota; pozitivní prediktivní hodnota.
- Nastínit možné kroky pro případ, že výsledek testu bude pozitivní → potvrzení výsledku testu pomocí amniocentézy nebo biopsie choria.
- Vysvětlit limitace testu v případě podezření na jiné chromozomální aberace vyžadující invazivní diagnostickou intervenci s následným testováním.

▲ Tab. 1: Body, které by měly být konzultovány společně s rodiči před absolvováním NIPT



graviditu, zamlklé těhotenství nebo přítomnost strukturální vady.²⁶ Pokud je NIPT proveden u pacientky se zvýšeným rizikem méně běžné chromozomální aberace (jiná než trizomie 21, 18, 13 a X nebo Y), je nutné pacientku informovat o potenciální možnosti nedetekovat klinicky významnou chromozomální aberaci, kterou bychom bez obtíží detekovali pomocí klasické invazivní diagnostiky. Dalšími skupinami, kdy není NIPT vhodný, je sonografický nález strukturální vady, hodnoty abnormálního šířového projasnění > 3,5 mm nebo extrémně abnormální nález sérových analytů mateřského séra v I. trimestru (byl-li proveden).²⁷ Není vhodné indikovat NIPT u pacientek s vysokým individuálním rizikem na základě výsledku kombinovaného testu I. trimestru. V případě vysokého rizika je indikovaná invazivní diagnostika. Trizomie 21, 13 a 18 představují zhruba 71 % všech chromozomálních aberací.²⁸ Pokud bychom u pacientek s rizikem vyšším než 1 : 50 nebo závažným morfologickým ultrazvukovým nálezem volili NIPT, nepodaří se detekovat 1 případ závažné aneuploidie z 302.²⁹ Pokud konzultujeme pár, který vyžaduje maximum informací týkajících se těhotenství, je vhodnější indikovat rovnou diagnostický test stanovující karyotyp.

NIPT a aberace gonozomů

Prevalence monozomie X (Turnerův syndrom) je udávána mezi 1–1,5 %.³⁰ Je doprovázena vysokým rizikem těhotenské ztráty. NIPT u monozomie X byl zaveden v roce 2012 a řada výrobců v současné době test nabízí. Řada aberací gonozomů však zcela nespĺňuje klasická kritéria pro celoplošný screening. Z tohoto důvodu se kolem NIPT u aberací gonozomů objevují četné, hlavně etické diskuse. Dalším potenciálním zdrojem diskusí je přesnost NIPT u aberací gonozomů, která není tak vysoká jako u trizomie 21, 18 a 13. Příčinou je vyšší potenciál pro maternální biologickou variabilitu X chromozomu.

Míra detekce (detection rate) Turnerova syndromu pomocí NIPT se pohybuje kolem 90,3 % při falešné pozitivitě 0,23 %.

Subchromozomální abnormality

Jsou zodpovědné za celou řadu dobře definovaných genetických syndromů, jako je například 22q11.2 deleční syndrom (Di George sy.), Cri du chat, Prader-Willi sy., Angelman sy. a jiné. Jejich příčina tkví v duplikaci nebo deleci DNA v rámci chromozomu. Řada těchto subchromozomálních abnormalit je příliš malá, aby byla detekována v rámci klasického vyšetření karyotypu, a tak jsou detekovány molekulárně cytogenetickými metodami (microarray). U 1,7 % sonograficky nepodezřelých plodů s normálním výsledkem klasického cytogenetického vyšetření je pomocí microarray detekována klinicky významná abnormalita na subchromozomální úrovni.³¹ Od roku 2013 řada výrobců nabízí NIPT platformu pro screening subchromozomálních abnormalit. Vzhledem k jejich nízké prevalenci (klinicky významné) je pozitivní prediktivní hodnota NIPT screeningu podstatně nižší než u ostatních aberací. Vysoká negativní prediktivní hodnota reflektuje spíše vzácnost jejich výskytu než efektivitu testu samotného.³²

Neshoda výsledku screeningového a diagnostického testu

Karyotyp materiálu získaného amniocentézou odráží skutečný karyotyp plodu, jelikož je stanoven ze skutečně fetálních buněk. V případě NIPT však mohou nastat stavy falešné positivity, jelikož je analyzován materiál DNA mateřského a fetoplacentárního původu. Můžeme tak detekovat odchylku, která má mateřský či placentární původ, nevyskytuje se však u plodu. Příčinami této biologické falešné positivity jsou například syndrom

mizejícího dvojčete, placentární mozaicismus, mateřská mikrodelece nebo neoplazie matky.³³

Zavedení NIPT zásadně změnilo koncepci screeningu vrozených vývojových vad. Jeho dostupnost klade větší nároky na konzultující lékaře a vyžaduje dokonalé pochopení principu, výhod a limitací tohoto testu, včetně jeho umístění do stávajících a etablovaných vyhledávacích testů. Body vhodné k diskusi s rodiči před podstoupením NIPT jsou uvedeny v tabulce 1.



Závěr

Screening nejčastějších typů autozomálních aneuploidií (trizomie 21, 18 a 13) na podkladě cfDNA v mateřské cirkulaci patří v současné době k nejlepšímu vyhledávacímu testu s mimořádnou senzitivitou a specifitou. Implementace tohoto testu do klinické praxe představuje pro zdravotníky výzvu. Důvodů je několik, technologie je zcela nová a rychle se dále vyvíjí, stále se učíme správně porozumět biologii cfDNA v mateřské plazmě a nelze opomenout ani ekonomické hledisko. Co se týče trizomie 21, 18 a 13, jedná se o screeningový test pro nízko i vysoko rizikovou populaci těhotných, který však kvůli existenci vzácné falešné positivity nedosahuje přesnosti diagnostického testu. Přesah NIPT k ostatním chromozomálním odchylkám a mikrodelečním syndromům nás nutí revidovat naše dosavadní zažitá pohledy na prenatalní screening.



doc. MUDr. Ladislav Krofta, CSc., MBA

Ústav pro péči o matku a dítě, Podolské nábřeží 157, Praha 4 – Podolí

Kontakt: ladislav.krofta@post.cz

Pracuje jako zástupce ředitele ÚPMD, je odborným asistentem na 3. LF UK v Praze a člen katedry gynekologie a porodnictví Institutu postgraduálního vzdělávání. Vystudoval 1. LF UK v Praze s atestací z gynekologie a porodnictví, urogynekologie a fetomaternální medicíny. Mimo to působí v řadě českých a zahraničních odborných organizací.

LITERATURA

1. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485–487.
2. Hagliac M, Vora NL, Basu S et al. Increased death of adipose cells, a path to release cell-free DNA in to systemic circulation of obese women. *Obesity (Silver Spring)* 2012; 202213–2219.
3. Alberry M, Maddocks D, Jones M et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 2007; 27: 415–418.
4. Wang E, Batey A, Struble C et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2013; 33: 662–666.
5. Hui L, Vaughan JI, Nelson M. Effect of labor on postpartum clearance of cell-free fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat Diagn* 2008; 28: 304–308.
6. Hill M, Twiss P, Verhoef T et al. Non-invasive prenatal diagnosis for cystic fibrosis: detection of paternal mutations, exploration of patient preferences and cost analysis. *Prenat Diagn* 2015; 35: 950–958.
7. Nicolaidis KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ* 1992; 304: 867–869.
8. Braithwaite J, Morris R, Economides D. Nuchal translucency measurements: frequency distribution and changes with gestation in a general population. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102: 957–962.
9. Pajkrt E, de Graaf I, Mol B et al. Weekly nuchal translucency measurements in normal fetuses. *Obstet Gynecol* 1998; 91: 208–211.
10. Kagan KO, Wright D, Baker A et al. Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31: 618–624.
11. Kagan KO, Wright D, Valencia C et al. Screening for trisomy 21, 18 and 13 by maternal age, fetal nuchal translucency, fetal heart rate, free β -hCG and pregnancy-associated plasma protein-A. *Human Reproduction* 2008; 23: 1968–1975.
12. Lo YM. Non-invasive prenatal testing using massively parallel sequencing of maternal plasma DNA: from molecular karyotyping to fetal whole-genome sequencing. *Reprod Bio-med Online* 2013; 27: 593–598.
13. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 16266–16271.
14. Chiu RW, Chan KC, Gao Y et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 20458–20463.
15. Zimmerman B, Hill M, Gemelos G et al. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn* 2012; 32: 1233–41.
16. Canick JA, Palomaki GE, Kloza et al. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn* 2013; 33: 667–74.
17. Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert J et al. 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: e010002.
18. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2016; 18: 1056–1065.
19. Gil MM, Quezada MS, Revello R et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; 45: 249–266.
20. Fiorentino F, Bono S, Pizzuti F et al. The importance of determining the limit of detection of non-invasive prenatal testing methods. *Prenat Diagn* 2016; 36: 304–311.
21. Yaron Y. The implications of non-invasive prenatal testing failures: a review of an under-discussed phenomenon. *Prenat Diagn* 2016; 36: 391–396.
22. Gil MM, Revello R, Poon LC et al. Clinical implementation of routine screening for fetal trisomies in the UK NHS: cell-free DNA test contingent on results from first-trimester combined test. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 47: 45–52.
23. Chitty LS, Wright D, Hill M et al. Uptake, outcomes, and costs of implementing non-invasive prenatal testing for Down's syndrome into NHS maternity care: prospective cohort study in eight diverse maternity units. *BMJ*; 354: i3426.
24. Chitty LS, Cameron L, Daley R et al. RAPID Non-invasive prenatal testing (NIPT) evaluation study. *Executive Summary*. 2015.
25. Nicolaidis KH, Syngelaki A, Ashoor G et al. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 207: 374.e1–6.
26. Vora NL, Robinson S, Hardisty SS et al. The utility of a prerequisite ultrasound at 10-14 weeks in cell free DNA fetal aneuploidy screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; 47: 465–469.
27. Petersen OB, Vogel I, Ekelund C et al. Potential diagnostic consequences of applying non-invasive prenatal testing: population-based study from a country with existing first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014; 43: 265–71.
28. Wellesley D, Dolk H, Boyd PA et al. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 521–526.
29. Maxwell S, Dickinson JE, Murch et al. The potential impact of NIPT as a second-tier screen on the outcomes of high-risk pregnancies with rare chromosomal abnormalities. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2015; 55: 420–426.
30. Hook EB, Warburton D. Turner syndrome revisited: review of new data supports the hypothesis that all viable 45, X cases are cryptic mosaics with a rescue cell line, implying an origin by mitotic loss. *Hum Genet* 2014; 133: 417–424.
31. Wapner RJ, Martin CL, Levy B et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med* 2012; 367: 2175–2184.
32. Hui L. Cell-free DNA testing for 22q11.2 deletion syndrome: appraising the viability, effectiveness and appropriateness of screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016; 47: 137–141.
33. Hartwig TS, Ambye L, Sorensen S et al. Discordant non-invasive prenatal testing (NIPT)-a systematic review. *Prenat Diagn* 2017; 37: 527–539.