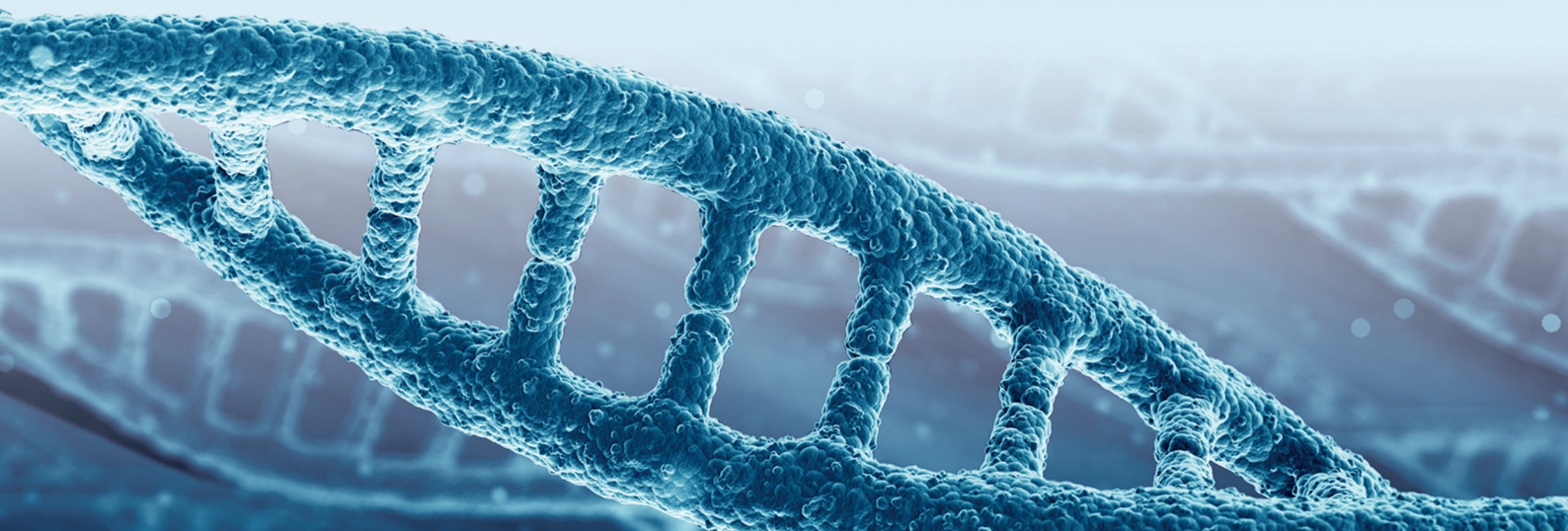


PrenaTest[®]

by lifeYcodexx



Egészségügyi szakembereknek szóló tájékoztató



PrenaTest®

by life**Y**codex**x**

Újgenerációs szekvenálást és z-score számítást alkalmazó,
non-invazív prenatális molekuláris genetikai vizsgálat
a magzati 13-as, 18-as és 21-es triszómia, valamint a nemi
kromoszómák számbeli rendellenességeinek kimutatására,
anyai vérből végzett DNS izolálást követően



- Zertifiziertes Managementsystem
- EN ISO 13485

Impresszum

LifeCodexx AG
Jakob-Stadler-Platz 7
78467 Konstanz

info@lifecodexx.com
www.lifecodexx.com

© LifeCodexx

New Era Genetics Kft.
Gábor Áron utca 74-78.
1026 Budapest

info@prenatest.hu
www.prenatest.hu

Irodalomjegyzék

1. Lo et al. Lancet 1997; 350:485-487.
2. Bischoff et al. Human Reprod Update 2004; 11:59-67.
3. Lo et al. Am J Hum Genet 1999; 64:218-224.
4. Nicolaides et al. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. Am J Obstet Gynecol 2012; 207:374.e1-374.e6.
5. Dan et al. Prenat Diagn 2012; 32:1225-1232.
6. Palomaki et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. Genetics in Medicine 2011; 13:913-920.
7. Benn et al. Ultrasound Obstet Gynecol 2012; 39:127-130.
8. ISPD Prenat Diagn 2012; 32:1-2.
9. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Committee Opinion No. 545, December 2012. www.acog.org Noninvasive Prenatal Testing for Fetal Aneuploidy
10. www.gfhev.de

Bevezetés

Az *újgenerációs szekvenálási* módszeren alapuló, non-invazív molekuláris genetikai vizsgáló módszer, a PrenaTest® nagy biztonsággal mutatja ki a magzati 13-as, 18-as és 21-es triszómiát és a nemi kromoszómák számbeli rendellenességeit az anya véréből. A PrenaTest® a bevezetése óta eltelt közel két évben egyre nagyobb szerepet játszik a prenatalis

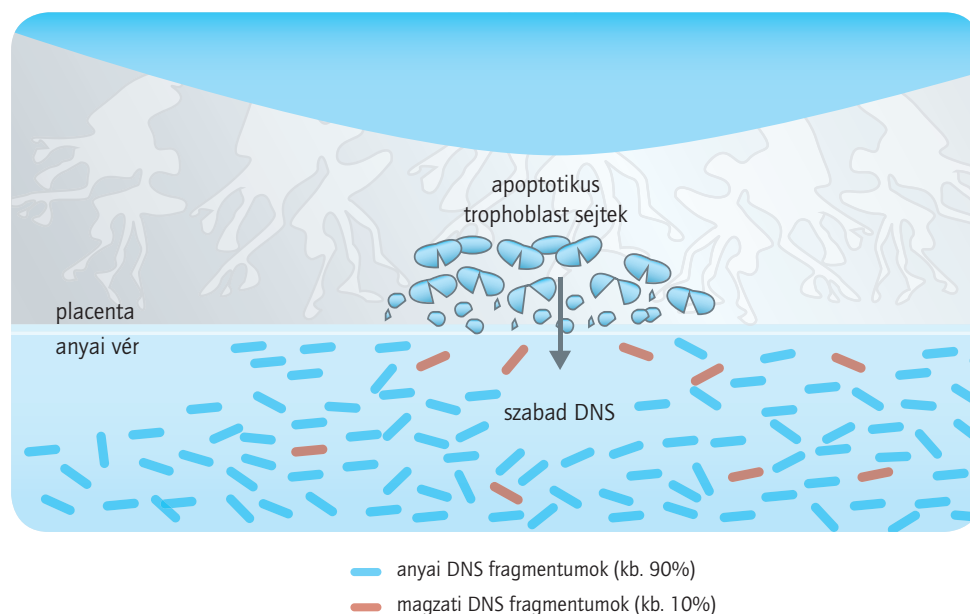
genetikai tesztelésben. Az invazív módszerekkel, például az amniocentézissel szemben ez a módszer nem jár vetelési kockázattal. A PrenaTest® vizsgálatot olyan várandósoknál tanácsos végezni, akik betöltötték terhességük 9. hetét, és akiknél emelkedett a magzati kromoszóma-rendellenességek kockázata.

A teszt tudományos alapja

A PrenaTest® a várandós vérében található szabad DNS elemzésén alapul. Ez a genetikai anyag, amely nem a sejteken belül, hanem a plazmában található, kisebb szakaszok (fragmentumok) formájában szabadon kering az anya vérében.

Az anyai vér az anya DNS-én kívül, átlagosan 10% magzati genetikai anyagot, szabad DNS-t is tartalmaz.¹ Ez a méhlepény elhalt sejtjeiből származik, és folyamatosan kerül a várandós vérébe.² (1. ábra).

1. ábra Az anyai vérben található szabad DNS eredete



A magzati DNS fragmentumok élettartama mintegy két óra, ezért a gyermek születése után néhány órával már nem mutatható ki magzati eredetű szabad DNS az anya vérében.³

A PrenaTest® segítségével egy anyai vérvétellel meghatározható, hogy eltér-e a normálistól a 13-as, 18-as vagy 21-es kromoszómáról, illetve a nemi kromoszómákról származó

magzati DNS mennyisége az anya vérében, és így non-invazív módon detektálható a magzati *Patau-kór*, *Edwards-kór* vagy *Down-kór*, valamint a gonoszomális aneuploidiák.

Az anyai vérben található szabad DNS vizsgálatán alapuló prenatális diagnosztikai eljárásokat *non-invazív prenatális tesztelésnek* (NIPT) nevezzük.

Példa az anyai és magzati eredetű DNS mennyiségi arányára az anyai vérben

Ha feltételezzük, hogy a várandós plazmamintájában 100 olyan fragmentum található, amely a 21-es kromoszómára jellemző, akkor 10%-os magzati DNS-arány esetén ebből 10 fragmentum lesz magzati és 90 fragmentum lesz anyai eredetű, ha a magzat normális kromoszóma-készlettel rendelkezik (euploid magzat). Ha a gravida magzata 21-es triszómiát hordoz (azaz a magzatnak 1,5-szörös mennyiségű a 21-es kromoszómára jellemző DNS-állománya), akkor a terhes véréből származó hasonló plazmaminta 105 olyan fragmentumot tartalmaz, amely a 21-es kromoszómára jellemző, és ebből 15 származik a magzattól és 90 az anyától. A PrenaTest® megbízhatóan érzékeli a 21-es kromoszómákról származó DNS 100:105 (1:1,05) arányát az anya vérében.

A magzati aneuploidiákat vizsgáló non-invazív prenatális tesztelés szabályozása Európában

A magzati aneuploidiákra irányuló NIPT-alapú vizsgálatok az in vitro diagnosztikai módszerekről szóló 98/79/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv (B lista, II. melléklet, IVD-módszerek) hatálya alá tartoznak.

Ez azt jelenti, hogy:

- Az elemző 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).



- Certified Management System
- EN ISO 13485



A magzati aneuploidiákat vizsgáló non-invazív molekuláris tesztek közül Európában csak a PrenaTest® felel meg ezeknek az előírásoknak. Ezért Európában a PrenaTest® az egyetlen, az uniós szabályoknak megfelelő – így az orvosi gyakorlatban legálisan használható – vizsgálat a magzati aneuploidiák non-invazív tesztelésére.

Mely várandósok esetében alkalmazható a PrenaTest®?

A PrenaTest® elvégzéséhez az alábbi feltételeknek kell teljesülnie:

- genetikai tanácsadás, illetve szakorvosi tájékoztatás a tesztől (ún. preteszt tanácsadás)
- a gravida betöltötte a terhesség 9. hetét (azaz legalább a 10. hétben van)
- a páciensnél a magzati kromoszóma-rendellenességek emelkedett kockázata állapítható meg, azaz egy vagy több fennáll az alábbi kockázati tényezők közül:
 - idősebb anyai életkor (≥ 35 év)
 - normálistól eltérő szérum markerek az anyai vérben
 - ultrahangvizsgálattal magzati anomália látható
 - szerkezeti vagy számbeli kromoszóma-rendellenességek a családban
 - egyéb kockázati tényezők, illetve orvosi okok (a páciens és az orvos közös döntése)

Meg kell azonban jegyezni, hogy a közelmúltban megjelent tanulmányok^{4,5} igazolták, hogy a NIPT teljesítménye ugyanolyan magas szintű az alacsony rizikójú várandósok csoportjában is, mint a magas rizikójú terhesek körében. Ennek elméleti alapja az, hogy a NIPT érzékenysége csak az anyai vérben található magzati eredetű DNS („*fetal fraction*”) arányától függ, amit nem befolyásolnak a magas rizikójú csoportba sorolás szempontjai (mint például a magasabb anyai életkor, az anamnézis, a kóros ultrahang, vagy a biokémiai markerek szintje az anyai vérben).

Az utóbbi időben történt fejlesztések eredményeként a NIPT ikerterhességben is igen magas érzékenységgel ad információt a magzati kromoszóma-rendellenességekre vonatkozóan.

A NIPT helye a prenatalis diagnosztikában

A PrenaTest® célja, hogy nagy pontossággal tesztelje a magzati számbeli kromoszóma-rendellenességek esetleges jelenlétét, különösképpen a magas vagy közepes kockázatú várandósoknál, például azoknál, akiknél a Down-kór hagyományos szűrő-módszereivel (pl. nyaki redő mérés, kombinált első trimeszteri szűrés) magasabb kockázat merült fel. Mivel az új teszt sokkal pontosabban képes elkülöníteni az euploid és az aneuploid magzatot hordozó terheseket, mint a hagyományos szűrő-módszerek (minimális az álpozitív esetek aránya), az *újgenerációs szekvenáláson* alapuló innovatív molekuláris genetikai módszer jelentősen csökkenti az elvégzendő invazív diagnosztikai beavatkozások (*amniocentesis, chorionboholymintavétel*) számát. Egyúttal csökkenti az ilyen beavatkozásokhoz kapcsolódó magzati veszteséget és anyai aggodalmat is.⁶

Egy 2012-ben publikált tanulmány szerint a magzati 21-es triszómia kockázata az adott terhességben 290-szeresére emelkedik pozitív NIPT eredmény esetén, míg negatív NIPT után a triszómia előfordulási gyakoriságának 110-szeres csökkenése figyelhető meg.⁷ Például egy terhes nő esetében, akinél az első trimeszteri szűrés a magzati triszómia 1:100 kockázatát igazolta, pozitív NIPT eredményt követően a kockázati arányszám 3:1-re módosulna – ami egyértelműen igazolja az invazív vizsgálat létjogosultságát az eredmények tisztázására vonatkozóan. Negatív NIPT eredménnyel a terhes kockázati szintje 1:1 000-re módosulna, ez a drámai csökkenés az esetek igen nagy százalékában nem tenné szükségessé az invazív diagnosztikai módszerek elvégzését.

A nemzetközi szülészeti és prenatalis diagnosztikai szakmai szervezetek állásfoglalásai alapján a NIPT jelenleg nem számít komplett diagnosztikai módszernek, ugyanakkor igen nagy pontosságú és magas diagnosztikai értékű szűrőteszteknek minősülnek.

A NIPT-re vonatkozó szakmai állásfoglalások/irányelvek

2012. október	Nemzetközi Prenatális Diagnosztikai Társaság (ISPD) Prenat Diagn 2012; 32:1-2
2012. november	Német Humánogenetikai Társaság (GfH) www.gfhev.de
2012. december	Amerikai Szülészeti-Nőgyógyászati Társaság (ACOG) www.acog.org

Nemzetközi Prenatális Diagnosztikai Társaság (ISPD)

Az ISPD jelenlegi álláspontja⁸ szerint a PrenaTest® használata átfogó és széles körű tanácsadással kombinálva ajánlott a hagyományos szűrőtesztekkel magas kockázatúnak talált várandósok további vizsgálatára (*másodlagos szűrőteszt*).

Amerikai Szülész-nőgyógyász Társaság (ACOG)

Az ACOG állásfoglalása⁹ már szélesebb spektrumban határozta meg az NIPT indikációit:

- *elsődleges szűrőteszt*, a magzati aneuploidiakra fokozott kockázatú terhesek elsődleges szűrővizsgálatára
- *másodlagos szűrőteszt* a hagyományos szűrőtesztekkel magas kockázatúnak talált várandósok további vizsgálatára

Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy idősebb, vagy egy adott triszómiára nézve nagyobb öröklődési kockázattal terhelt várandósok az *első trimeszterben esedékes szűrővizsgálat elvégzése nélkül is felajánlható a NIPT*.

Német Humánogenetikai Társaság (GfH)

A GfH állásfoglalása¹⁰ új megvilágításba helyezi a szakmai vitát, hogy ti. a NIPT ajánlható-e a magzati kromoszóma-rendellenességre nem magas rizikójú várandósoknak vagy sem? A GfH szerint: „Mivel a nem-invazív diagnosztikai módszerek mérlegelése kapcsán már nem merülhet fel a gyermek egészségi állapotának iatrogén károsodása, a NIPT-et elérhetővé kell tenni minden terhes nő számára, illetve senkitől sem tagadható meg a vizsgálat.”

A GfH ajánlása szerint a betegségek és a különböző rendellenességekre való hajlam prenatális diagnosztikájára vonatkozó irányelvek egyértelműen kimondják, hogy a kezelő orvos kötelessége a terhes nőt tájékoztatni:

- „...az invazív diagnosztikus vizsgálatok által okozott magzati károsodás lehetőségéről”
- „...az invazív vizsgálat által okozott károsodás lehetősége miatt az összes alacsony kockázatú vizsgálati módszerről”.

A Humánogenetikai Diagnosztikáról és Genetikai Tanácsadásról szóló irányelvek kritériumként szabják meg, hogy

„a páciens számára hozzáférhetővé kell tenni az összes orvosi célból szerzett információt, adatot és eredményt, annak érdekében, hogy biztosítva legyen számára a független és informált döntés lehetősége.”

Ennek megfelelően a kezelőorvos és/vagy a tanácsot adó orvos kötelessége, hogy az összes terhesnek nyújtson megfelelő tájékoztatást az invazív prenatális diagnosztikus módszerekről és a NIPT-ről egyaránt.

Ki ajánlhatja a tesztet?

Mivel a PrenaTest® egy reprodukciós genetikai vizsgálat, Magyarországon a Nemzeti Erőforrás Minisztérium szakmai protokollja (*Egészségügyi Közlöny 2005.12 sz; 2010.4.sz.*)

értelmében genetikai tanácsadást kell nyújtani a vizsgálat elvégzése előtt, illetve pozitív eredmény esetén a vizsgálat után is.

Hogyan működik a PrenaTest®?

1. Genetikai tanácsadás és a várandós hozzájárulásának kikérése után a páciens-től 20 ml vénás vér kerül levételre, speciálisan erre a célra tervezett csőbe (*Cell-Free DNA™ BCT, Streck Innovations – a LifeCodexx bocsátja rendelkezésre*).
2. Az anyai vérminta az előírt körülmények között és megfelelő időtartamon belül a Lifecodexx laboratóriumába kerül.
3. A laboratórium először elkülöníti a plazmát.
4. Ezt követően a plazmából izolálják a sejtmentes genetikai anyagot (szabad DNS). A sikeres analízis feltétele, hogy az anyai DNS-sel kevert genetikai anyag legalább 4% szabad magzati DNS-t tartalmazzon. Amennyiben a szabad DNS keveréknek kevesebb, mint 4%-át alkotja magzati DNS, újabb vérvétel elvégzése javasolt.
5. Az izolálás során relatíve kis mennyiségű szabad DNS nyerhető ki az anyai vérplazmából. Miután meghatározásra kerül a magzati DNS százalékos aránya, elsőként egy ún. genomkönyvtárat kell előállítani, majd megtörténik a különböző DNS szakaszok megsokszorozása (amplifikáció).
6. A nyert DNS fragmentumokat a legújabb elemző berendezések segítségével dekódolják (DNS szekvenálás az Illumina HiSeq2500 technológián alapuló, nagy volumenű parallel szekvenálási módszer, a *massively parallel sequencing* – MPS segítségével). Az így nyert szekvenciákat előírt minőségi kritériumokat figyelembe véve rendszerezik az egyes kromoszómák szerint.
7. Az értékelés a PraenaTest® DAP.plus szoftver segítségével történik.

Értékelés a PraenaTest® DAP.plus szoftver segítségével

A PraenaTest® DAP.plus egy egyedi fejlesztésű és CE jelzéssel ellátott program, mely első körben osztályozza a generált szekvenciákat (leolvasásokat) meghatározott minőségi kritériumok alapján (2. ábra) és kromoszóma számok szerint (3. ábra). Ezt követően meghatározza a 13-as, 18-as és 21-es kromoszóma és a nemi kromoszómák genetikai anyagának mennyiségét (4. ábra). Ez a mennyiség az összes DNS-szekvencia százalékaként definiálható.

Mintánként („single-read sequencing”):

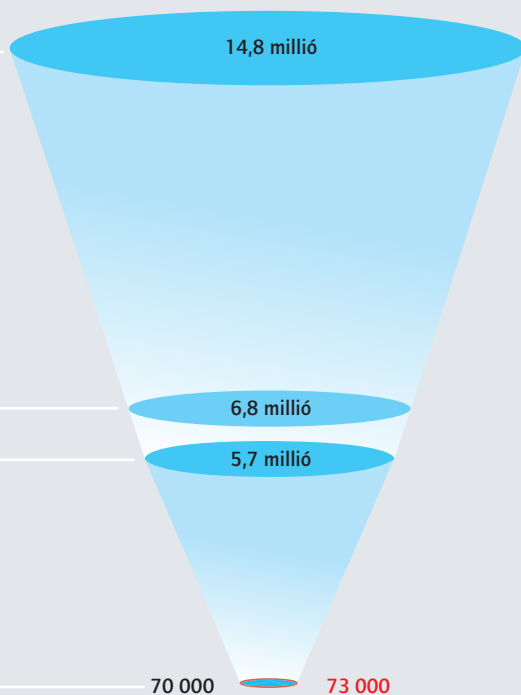
a program mintegy 14,8 millió, 36 bázispár hosszúságú DNS-szakasz leolvasását végzi (ez a humán genom 8%-a);

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”)

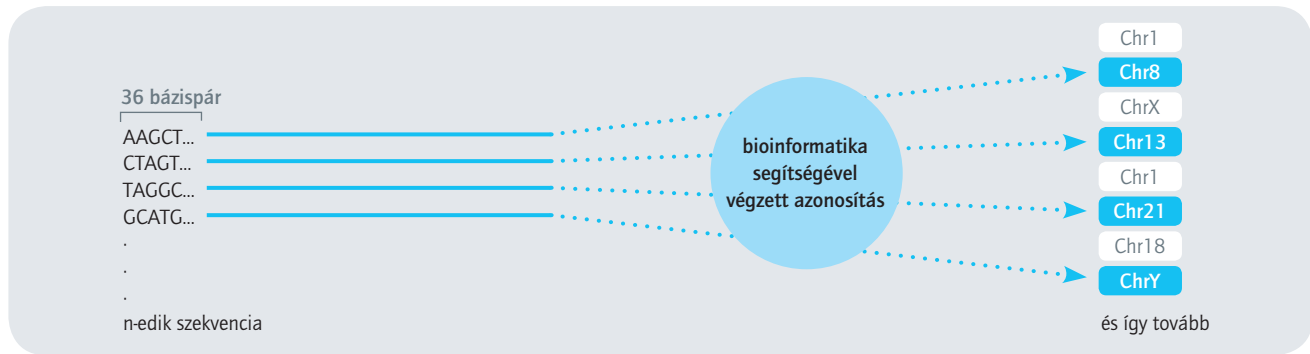
ebből kb. 70 000 leolvasás tartozik a 21-es kromoszómához euploid magzat esetén (1,2%)

illetve kb. 73 000 leolvasás tartozik a 21-es kromoszómához 21-es triszómiás magzat esetén (1,32%)

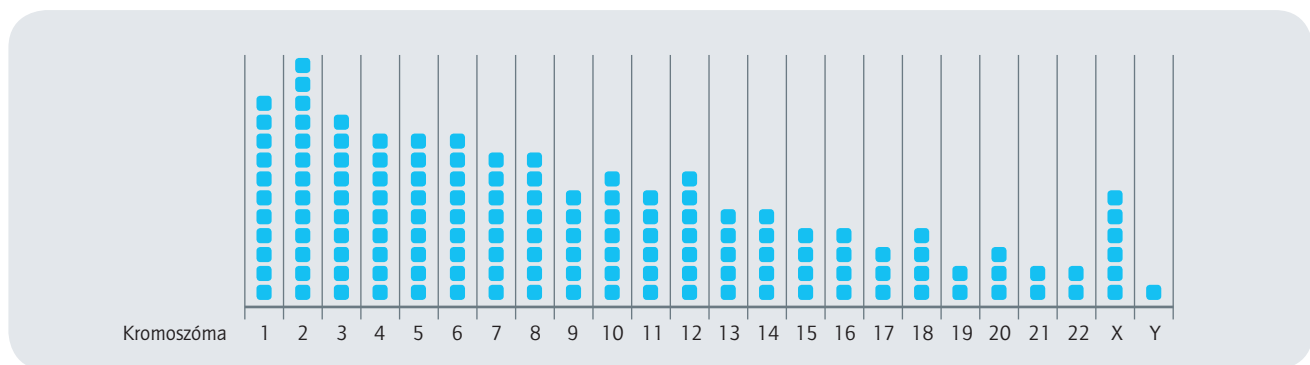


2. ábra A DNS fragmentumok vizsgálata

3. ábra Szekvenálás és a szekvenciák azonosítása



4. ábra A szekvenciák számlálása



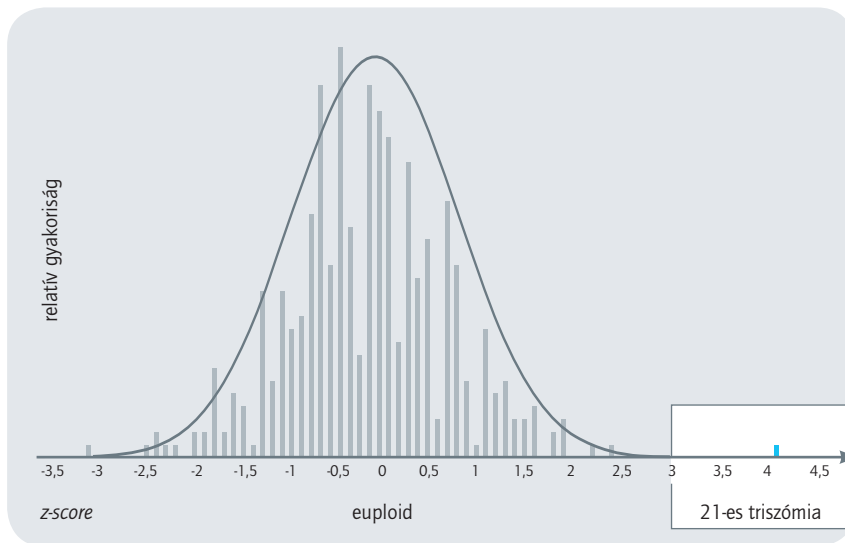
A kvantifikáció végzése közben a szoftver figyelembe veszi azt a tényt, hogy a különböző kromoszómák eltérő arányú GC bázispárral rendelkeznek. A molekuláris biológiai technikák alkalmazása közben a GC-ben gazdag szekvenciák az AT-gazdag szekvenciáktól eltérő módon viselkednek, és a szekvenált DNS a GC-gazdag szakaszok eltérő arányát mutatja („sequencing bias”). A program „GC normalizációs” funkciója bioinformatikai módon korrigálja ezt az aránytalanságot.

A 21-es kromoszóma nagyjából azonos arányban tartalmaz GC- és AT-gazdag szakaszokat, vagyis ez a normalizációs funkció nem létfontosságú a 21-es kromoszóma analízisének tekintetében. Ugyanakkor pl. a 13-as kromoszómában jelen-

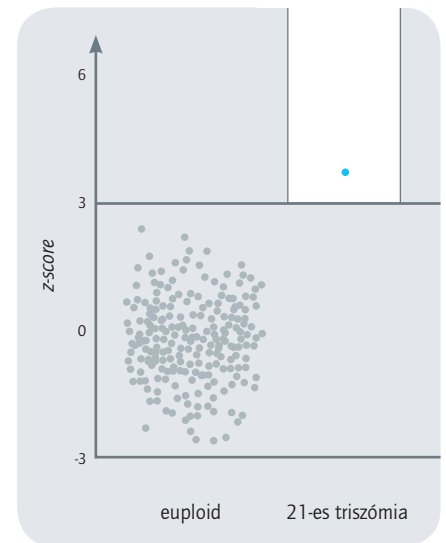
tősen nagyobb arányban vannak GC szakaszok, így a pontos 13-as kromoszóma analízis vonatkozásában a GC normalizáció elengedhetetlen lépés. Hasonlóképpen, a 18-as kromoszóma és az X kromoszóma pontos analíziséhez is szükség van a GC normalizációra.

Ezt követően egy validált algoritmus segítségével számítás történik annak meghatározására, hogy a 13-as, 18-as vagy 21-es kromoszómáról származó DNS mennyisége a vizsgált mintában meghaladja-e az euploid kromoszómakészlet esetében található mennyiséget. Az euploid magzat esetén mért DNS mennyiségek Gauss-féle normál eloszlást követnek, harang alakú görbével ábrázolhatók (5. ábra).

5. ábra Példa a *z-score* értékek gyakorisági eloszlására



6. ábra Egy euploid referenciacsoport és egy 21-es triszómiás eset *z-score* értékeinek ábrázolása pontábrán formájában



Ezután kerül kiszámításra az adott minta *z-score* néven ismert értéke. A *z-score* annak a mértéke, hogy milyen messze esik a vizsgált minta esetében meghatározott 21-es kromoszóma (illetve 13-as, 18-as, X- vagy Y-kromoszóma) szekvenciák aránya az euploid (referenciaként használt) mintákban meghatározott arányok mediánjától a referenciacsoport átlagos abszolút deviációjában (*MAD*) kifejezve (5. ábra)

A *z-score* számításához az alábbi képletet használják:

$$z(Chr\ n)_{sample} = \frac{\%(Chr\ n)_{sample} - Median(Chr\ n)_{reference}}{MAD(Chr\ n)_{reference}}$$

Ha a *z-score* értéke 3 alatt van, akkor tipikusan az adott terhességben nincs jelen magzati triszómia. Az ilyen terhességek *z-score* értékeinek eloszlása megfelel a normál Gauss-eloszlásnak (5. ábra). A 3-at elérő vagy meghaladó *z-score* értékek általában valamilyen triszómia (illetve 13-as vagy 18-as triszómia) jelenlétére utalnak. Ha a kérdéses minta esetében mért érték és a referenciacsoport medián értéke közötti különbség, amely a referenciacsoport átlagos abszolút deviációjában (*MAD*) van kifejezve, meghaladja a statisztikailag meghatározott három standard deviációnyi értéket, akkor pl. a 21-es kromoszóma 99,87%-ot meghaladó valószínűséggel a szokásosnál nagyobb mennyiségben van jelen.

A vizsgálati módszer hatékonysága

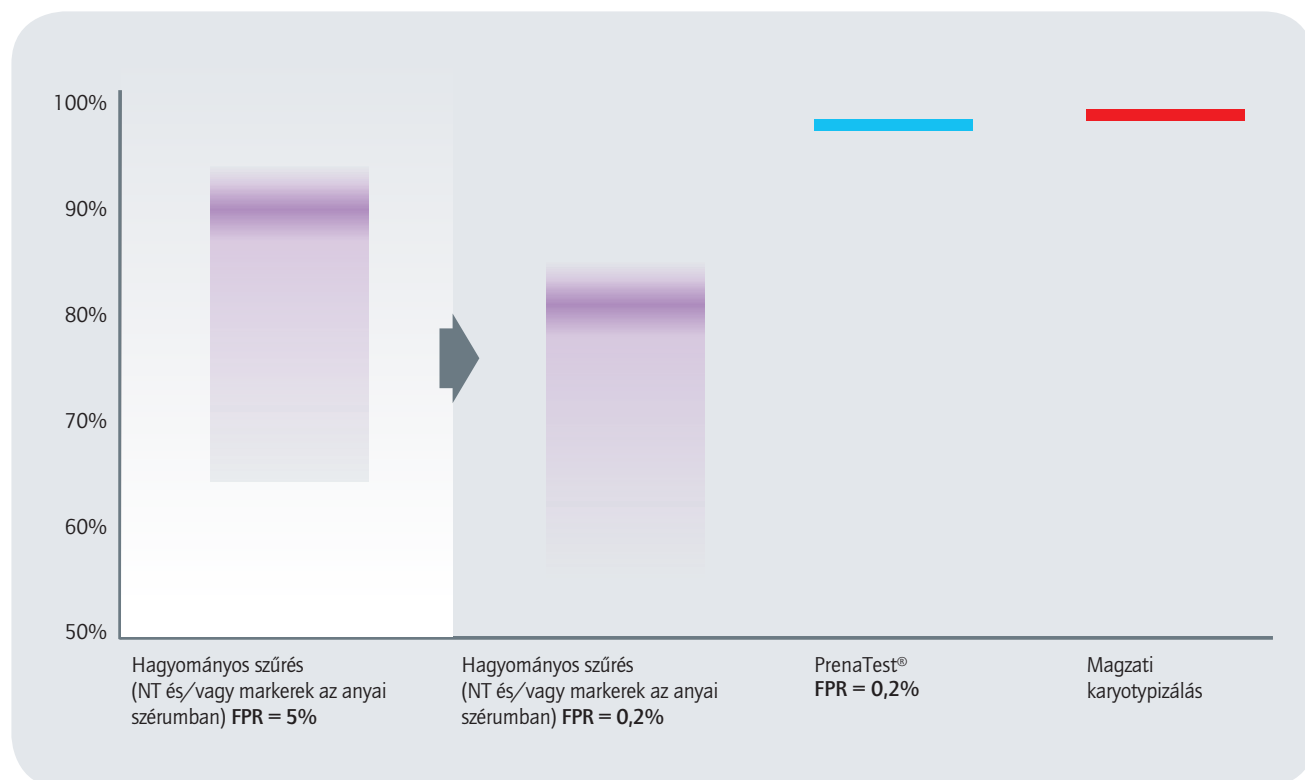
A PrenaTest® hatékonysága nemzetközi klinikai vizsgálatokban, nagy beteganyagon került meghatározásra, s a bevezetése óta eltelt csaknem két év alatt elvégzett 7526 vérminta analízise és értékelése után a teszt detekciós rátája 99,9%-nak, specificitása 99,83%-nak bizonyult. Down-kórt 84 esetben (1,7%), Edwards-kórt 26 esetben (0,4%), Patau-kórt 9 esetben (0,1%) jelzett a vizsgálat. A PrenaTest® 7512 esetben adott korrekt eredményt (>99,8%). A fals pozitív arány 21-es triszómiára nézve 0,03%, 18-as triszómiára nézve 0,13%, míg 13-as triszómiára nézve 0,01% volt. A fals pozitív eredmények csaknem felében valamilyen biológiai ok (placentára lokalizálódó mozaikosság, anyai mozaikosság, korábban elhalt ikermagzat – „vanishing twin”) állt. (Azaz a PrenaTest® által jelzett eredmény korrekt volt, nem „fals”, csak nem a magzatra vonatkozott. Helyesebb ezeket az eredményeket ezért „diszkordáns” eredményeknek nevezni, nem fals pozitív eredménynek.)

Az *újgenerációs szekvenálás*on alapuló molekuláris genetikai vizsgálati módszer bizonyítottan alkalmas a 21-es triszómia, a 18-as triszómia és a 13-as triszómia és a gonoszomális aneuploidák kimutatására, számos klinikai vizsgálat eredménye alapján.

A PrenaTest® jelenleg a 13-as, 18-as és 21-es kromoszóma és a nemi kromoszómák vizsgálatára használható. Bár a vizsgálattal jelenleg nem adható vélemény a kromoszómák szerkezeti eltéréseiről, a deletiós/mikrodeleciós syndromák kimutatása tudományos kísérletek szintjén már megvalósult, s hamarosan várható klinikai bevezetésük.

Ritkán a triszómiákat a kromoszómákat érintő kisebb szerkezeti anomáliák okozhatják, melyeket egyelőre nem képes felismerni a klinikai felhasználásban elérhető teszt. Az egyéb kromoszóma-rendellenességek és genetikai betegségek jelenleg nem tartoznak a PrenaTest® hatálya alá.

7. ábra A magzati 21-es triszómia tesztelésére alkalmazott non-invazív és invazív módszerek érzékenységeinek összehasonlítása



FPR = fals pozitív ráta; NT = nuchal translucency

A PrenaTest® magyarországi disztribútora



New Era Genetics

1026 Budapest, Gábor Áron utca 74–78.

Telefon: +36 1 273 1913

info@prenatest.hu

www.prenatest.hu

PrenaTest®
by lifeYcodexx