بسم الله الرحمن الرحیم

تست های غربالگری دوران بارداری با تاکید بر cffDNA

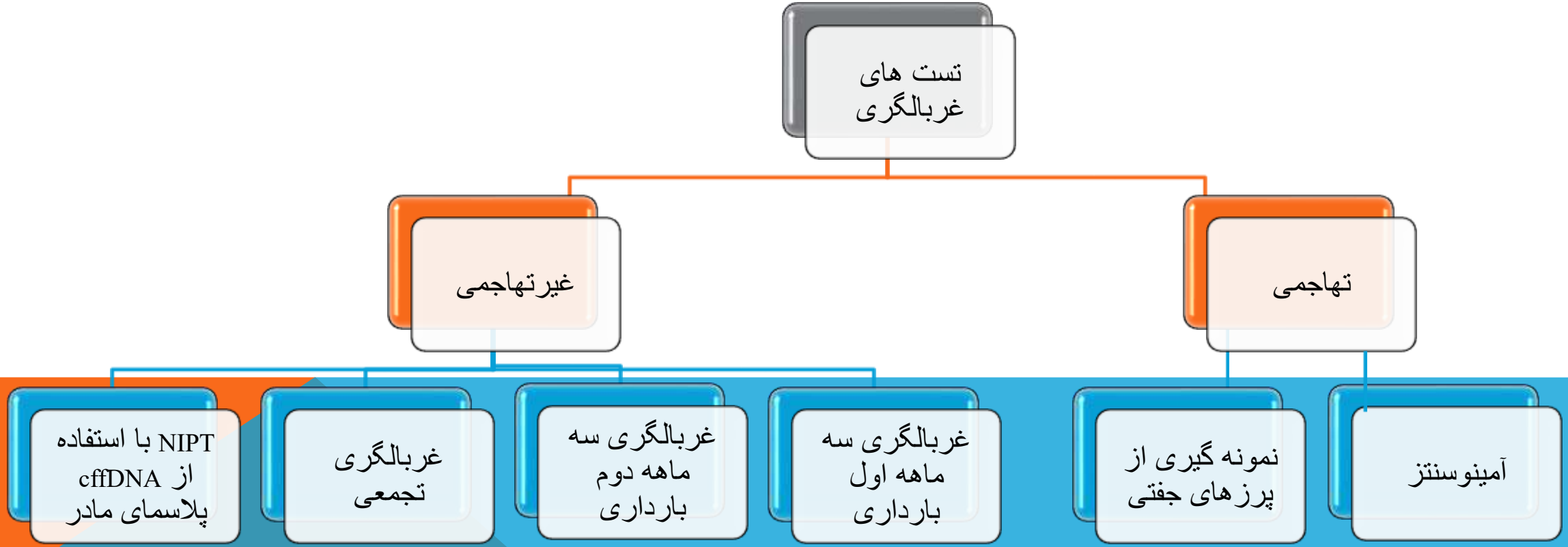
مدرس: دکتر امیرحسین دوستی مطلق

دانشیار دانشگاه علوم پزشکی یاسوج



مقدمه

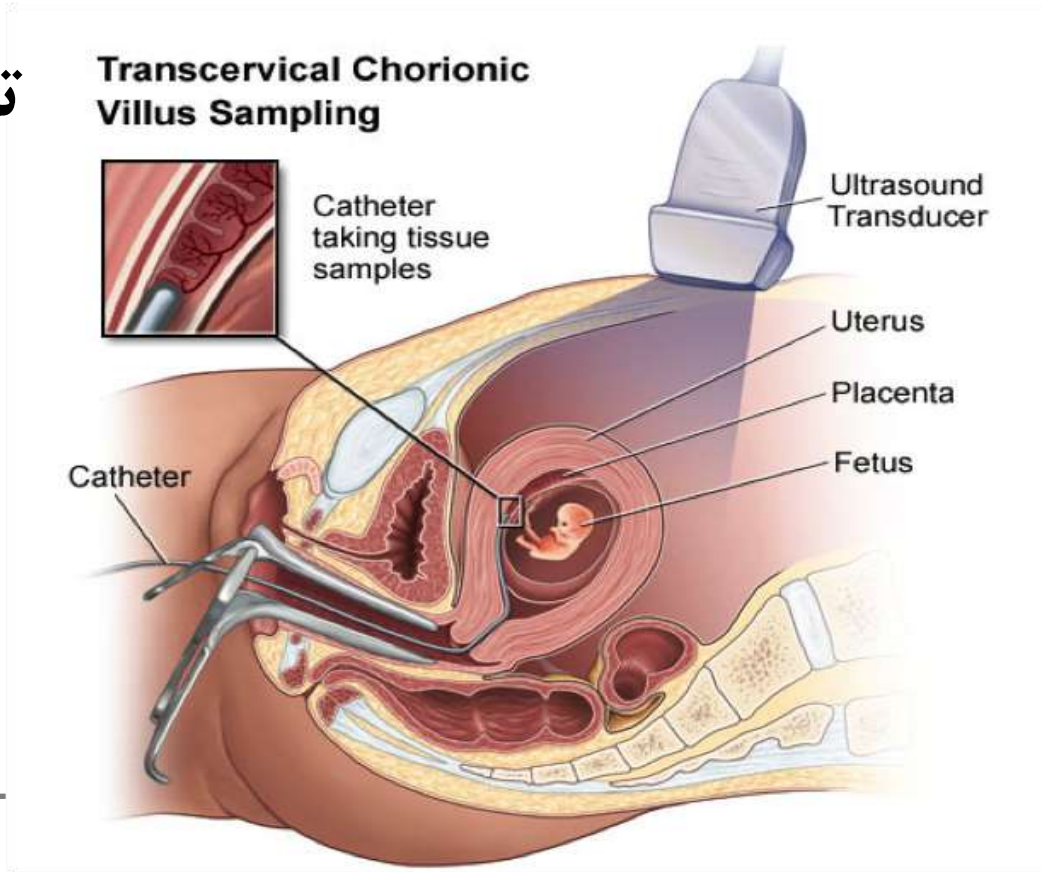
تست‌های غربالگری سلامت جنین عموماً به منظور تشخیص قبل از تولد سندرم داون (تریزومی ۲۱)، سندرم ادوارد (تریزومی ۱۸)، سندرم پاتو (تریزومی ۱۳) و پره اکلامپسی انجام می‌شود. این تست‌ها به دو دسته تهاجمی و غیرتهاجمی تقسیم می‌شوند؛



مقایسه روش های غربالگری سندرم داون

روش	قدرت تشخیص	مثبت کاذب	سن بارداری	ماهیت روش
غربالگری با استفاده از مارکرهای شیمیایی خون مادر	٪۹۰–٪۷۰	٪۵	۱۱–۱۳+۶ ۱۵–۲۰+۶	غیر تهاجمی
سونوگرافی NT	٪۸۰–٪۶۰	٪۵	۱۱–۱۳+۶	غیر تهاجمی
CVS	٪۱۰۰	صفر	۱۰–۱۳	تهاجمی (خطر سقط ۱ تا ۲ درصد)
آمنیوسنتز	٪۱۰۰	صفر	۱۵–۲۰	تهاجمی (خطر سقط ۰/۵ تا ۱ درصد)
NIPT	٪۹۹ <	٪۱ >	از هفته ۱۰	غیر تهاجمی

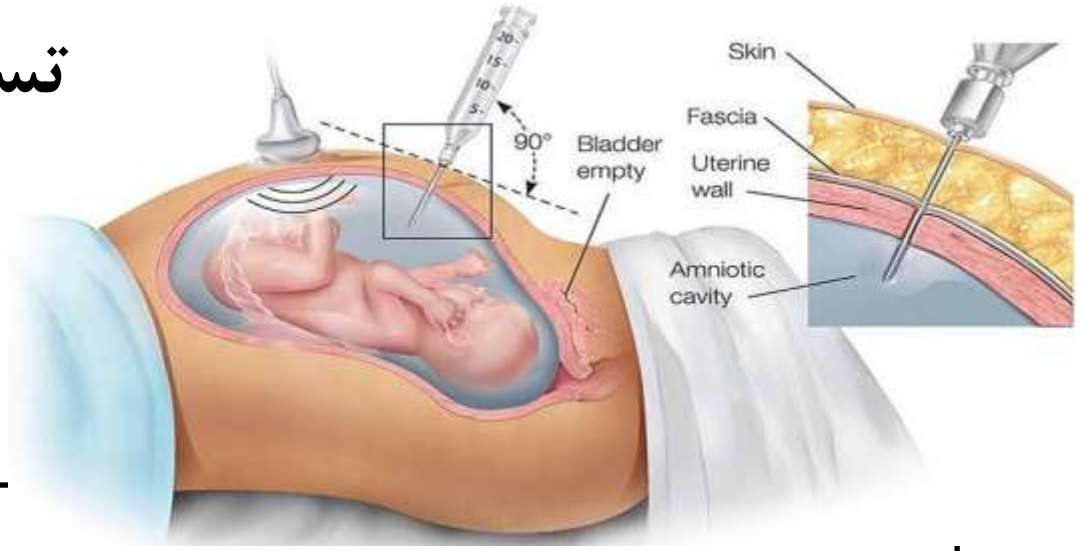
تست های غربالگری تهاجمی



نمونه گیری از پرزهای جفتی (CVS)

این روش به منظور تشخیص ژنتیکی در دوران جنینی بین هفته ۱۰ تا ۱۳ بارداری انجام می‌گیرد. در این روش پرزهای کوریونی از جفت گرفته شده و بررسی کروموزومی بر روی آن انجام می‌گیرد. خطر سقط ناشی از این روش نیز ۲-۱٪ است (۲).

تست های غربالگری تهاجمی



ایراد اصلی تست‌های غربالگری تهاجمی سقط جنین ناخواسته می‌باشد.

آمنیوسنتز

آمنیوسنتز یک تکنیک تشخیصی قبل از تولد است که طی آن حدود ۲۰-۱۵ میلی‌لیتر از مایع آمنیون اخذ و مورد بررسی ژنتیکی قرار می‌گیرد. این روش یکی از رایج‌ترین روش‌های تهاجمی تشخیصی قبل از تولد در سه‌ماهه‌ی دوم بارداری است. آمنیوسنتز بین هفته‌های ۱۵ تا ۲۲ بارداری انجام می‌شود و انجام آن زودتر از این زمان منجر به آسیب جنین می‌شود. از عوارض آمنیوسنتز می‌توان به زایمان زودرس، دیسترس تنفسی، ناهنجاری‌های جسمی، آسیب به جنین و بیماری‌های مربوط به Rh مادر اشاره کرد. مطالعات اخیر، خطر سقط ناشی از روش آمنیوسنتز را ۰/۶ ٪ تا ۰/۸۶٪ تخمین زده است (۱).

تست‌های غربالگری غیرتهاجمی

اشکال اصلی روش‌های تست‌های غربالگری غیرتهاجمی، میزان مثبت کاذب بالای آنها می‌باشد.

غربالگری سه ماهه اول بارداری

این تست در بین هفته ۱۰ تا ۱۴ حاملگی انجام می‌شود. در این روش از مارکرهای سونوگرافی (NT یـا ضـخامت پشت گردن رحم) و بیوشیمی (PAPP-A و β-HCG) استفاده می‌شود. حساسیت آن برای غربالگری سندرم داون ۸۷-۸۲٪ و میزان مثبت کاذب آن حدود ۵٪ است.









غربالگری سه ماهه دوم بارداری

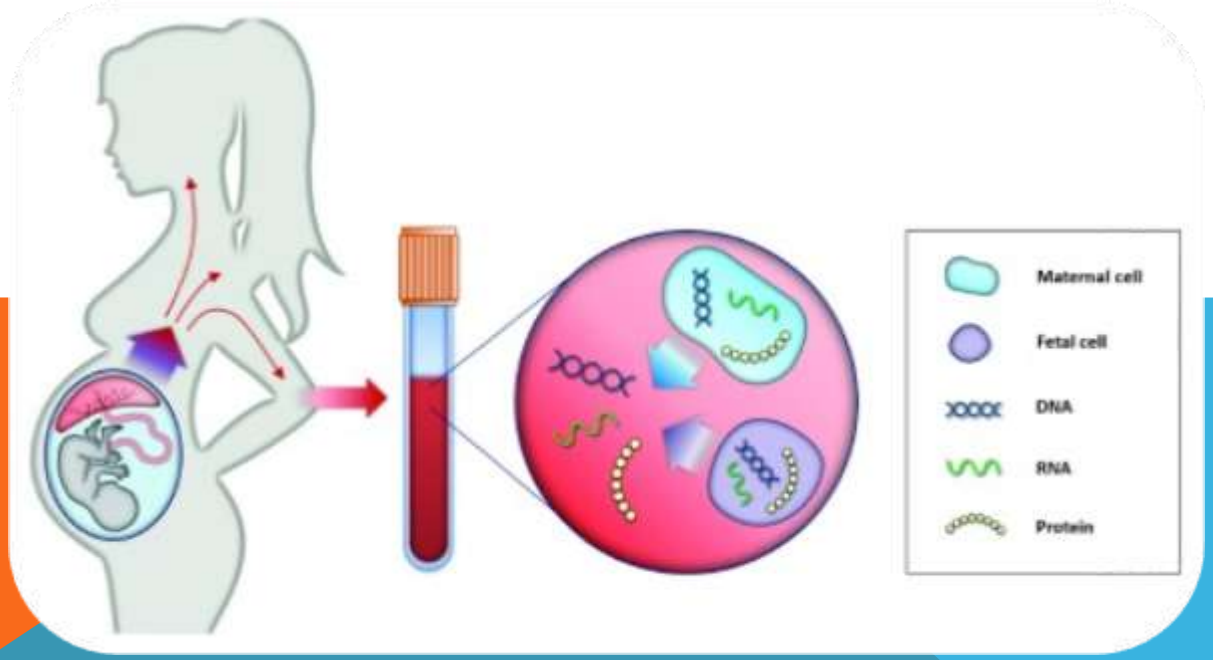
نام دیگر این تست کواد است و در بین هفته ۱۵ تا ۲۰ حاملگی انجام می‌شود. در این روش مارکرهای بیوشیمیایی (شامل β-HCG، آلفا فیتوپروتئین، استریول غیرکنژوگه و اینهیبین A) اندازه‌گیری می‌شوند. حساسیت این روش برای غربالگری سندرم داون حدود ۸۰٪ و میزان مثبت کاذب آن حدود ۵٪ است (۳).

غربالگری تجمعی

از ترکیب معیار خطر محاسبه شده در سه ماهه اول و دوم بدست می‌آید و حساسیت این تست برای غربالگری سندرم داون ۹۷-۹۴٪ است.

NIPT با استفاده از cffDNA موجود در پلاسمای مادر

روش جدید و غیرتهاجمی غربالگری است که با استفاده از تکنولوژی تعیین توالی، میزان افزایش DNA آزاد جنین را در خون مادر از هفته دهم بارداری بررسی می‌کند. در این روش بدون نیاز به سلول های بافت جفت (CVS) یا نمونه گیری از مایع آمنیوتیک (آمنیوسنتز)، از چند میلی لیتر خون وریدی مادر استفاده شده و در یک تست همزمان، تریزومی های ۲۱، ۱۸ و ۱۳ بررسی می‌شود. حساسیت این روش برای غربالگری سندرم داون بیش از ۹۹٪ و میزان مثبت کاذب آن کمتر از ۰/۱٪ است (۴, ۵).



مقدمه

در سال ۱۹۹۷، Dennis Lo و همکارانش برای اولین بار وجود DNA آزاد جنینی را در خون مادر گزارش دادند. نیمه عمر این DNA بسیار کوتاه و حدود ۱۶ دقیقه است و در کمتر از ۲ ساعت بعد از تولد از خون مادر حذف می‌شود. cffDNA عمدتاً از سلول‌های جفتی آپوپتوتیک جنینی آزاد می‌شود (۶). اما مکانیسم‌های دیگری نیز برای آزاد شدن DNA جنینی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به آزاد شدن DNA از سلول‌های هماتوپوئیتیک جنینی و انتقال مستقیم مولکول‌های DNAاشاره کرد. DNA موجود در خون مادر شامل DNA مادری و DNA جنینی است که به صورت قطعات کوتاه (۲۰۰-۱۵۰ جفت باز) در گردش خون دیده می‌شوند. منشاء اصلی DNA مادری (cfDNA) سلول‌های خونی مادر می‌باشد. میزان DNA جنینی موجود در پلاسمای مادر از ۵٪ تا ۱۰٪ متغیر است؛ این مقدار با پیشرفت بارداری افزایش می‌یابد و در اواخر دوران بارداری به حداکثر می‌رسد (۷).



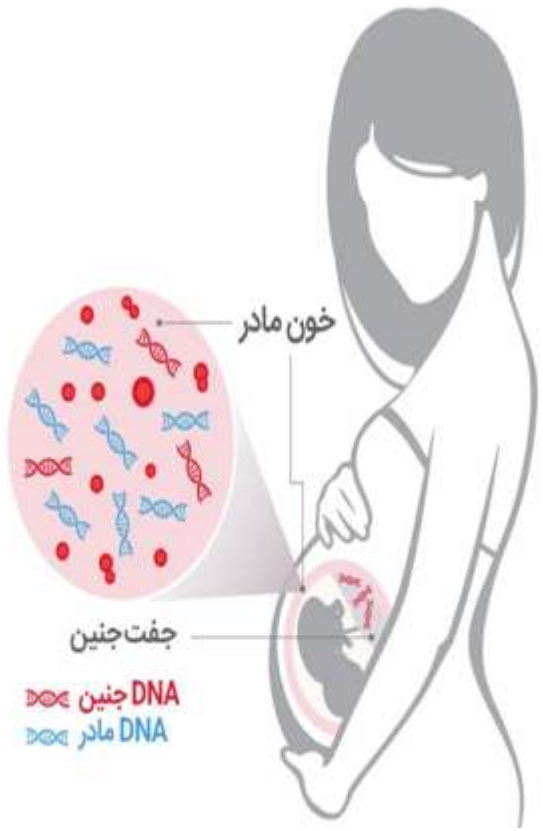
مقدمه

آزمایش NIPT مخفف Noninvasive Prenatal Testing یا تست غیرتهاجمی قبل از تولد است. یک آزمایش غربالگری است که در دوران بارداری انجام می شود تا تشخیص دهند آیا جنین در معرض خطر ابتلا به اختلالات کروموزومی است یا خیر؟

تست NIPT با نمونه گیری از خون مادر انجام می شود که حاوی DNA جنین است.اغلب DNAموجود در بدن درون هسته سلول ها هستند. اما DNA آزاد جنینی DNAای است که در سلول قرار ندارد و به صورت شناور در خون است. DNA آزاد جنینی وقتی سلول می میرد و متلاشی می شود، به جریان خون ترشح میشود. تاکنون غربالگری این ناهنجاری ها از طریق روش های تهاجمی مانند chronic villus sampling (CVS) و یا آمینوسنتز صورت میگرفته است. این روش های تهاجمی (آمنیوسنتز) خطر سقط جنین را افزایش میدهند. غربالگری اولیه NIPT کمک میکند تا از انجام تست های غیرضروری و بالقوه مهاجم جلوگیری شود.

هیچ گونه خطری برای مادر و جنین وجود ندارد.

مقدمه



بحث استفاده از DNA آزاد موجود در گردش خون مادری با منشاء جنینی از سال ۱۹۹۷ مطرح شده است.این کشف مهم با ردیابی قسمت هایی از کروموزوم Y جنینی در سرم مادر توسط Dennis Lo صورت گرفت. منشاء cffDNA از سلول‌های تروفوبلاست جفت بوده و به دنبال پوسته ریزی این سلولها وارد گردش خون مادر شده و ۱۳- ۳٪ کل DNA آزاد موجود در گردش خون مادر را تشکیل می‌دهد. **cffDNA در هفته ۷ بارداری در خون مادر ظاهر و بلافاصله بعد از تولد نوزاد از گردش خون وی پاک می‌شود،** طوری که ۲ ساعت پس از زایمان دیگر در خون مادر قابل تشخیص نیست.



مزایای استفاده از cffDNA

صحیح‌ترین تست غربالگری غیر تهاجمی است که در حال حاضر برای تشخیص آنوپلوئیدی وجود دارد و تشخیص زودهنگام را ممکن می‌سازد.

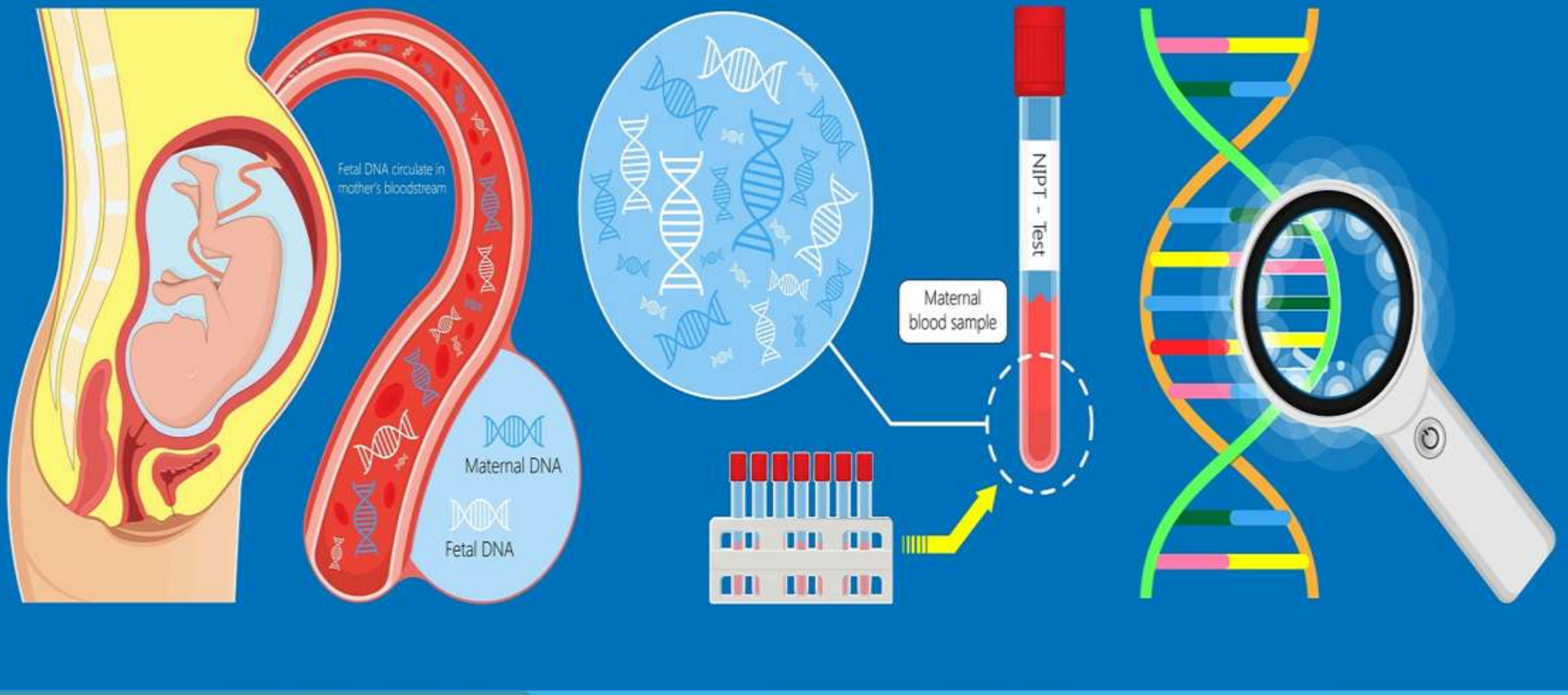
محدودیت‌های استفاده از cffDNA

برای اطمینان از وجود اختلال، می‌بایست علاوه بر تست cffDNA، تست غربالگری تهاجمی (CVS یا آمنیوسنتز) نیز انجام شود. همچنین در مواردی که میزان DNA جنینی موجود در پلاسمای مادر کمتر از ۴٪ باشد، نمونه‌ها با این تست قابل تفسیر نیستند.

جمع‌آوری نمونه و استخراج DNA

ده تا بیست میلی‌لیتر خون محیطی در لوله حاوی ۲۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۵ مولار جمع‌آوری و سریعاً به دمای ۴ درجه سانتیگراد منتقل می‌شود. نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ g سانتریفوژ و محلول رویی (حاوی پلاسما و بافی‌کوت) با دقت جدا شده و به لوله فالکون ۱۵ میلی لیتری منتقل می‌شود. در مرحله بعد به کمک کیت، DNA ژنومی استخراج می‌گردد. مطالعه‌ی Wong و همکاران در سال ۲۰۱۳ در خصوص پایداری cffDNA نشان داد که میزان cffDNA موجود در پلاسمای مادر به **مدت ۷ روز در طیف دمایی (۴، ۲۳، ۳۷ و ۴۰ درجه سانتیگراد) پایدار است،** در حالی که در دمای بالاتر از ۲۳ درجه سانتیگراد میزان DNA توتال (عمدتاً مادری) به خاطر تجزیه سلول‌های مادر و آزاد شدن DNA آن‌ها افزایش می‌یابد (۸).

Noninvasive Prenatal Testing (NIPT)



فاکتورهایی که بر میزان cffDNA تأثیر می‌گذارند

1

میزان cffDNA با پیشرفت بارداری افـزایش مـی‌یابـد، مطالعـه Wang و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داد کـه میـانگین cffDNA در هفته دهم (روز ۱ تا ۶) ۱۰/۲٪ بود که تا هفته ۲۱ بـه تـدریج هفتـه‌ای ۰/۱٪ و از هفته ۲۱ به بعد هفته‌ای ۱٪ افزایش یافت (۹).

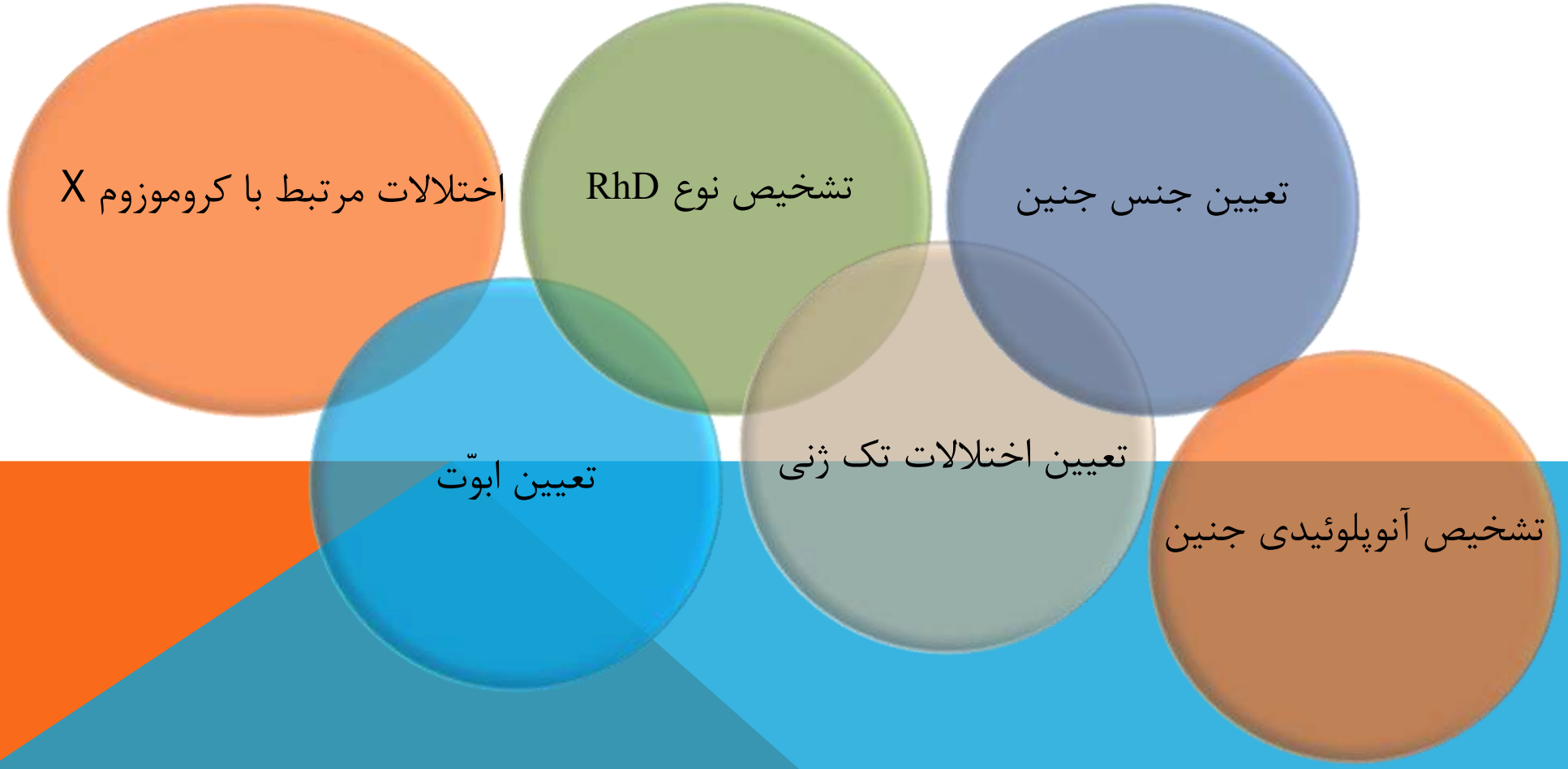
2

میزان cffDNA با افزایش وزن مادر کاهش می‌یابد (۹).

3

مطالعه Urato و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد کـه **میزان cffDNA در سرم زنان باردار سیگاری سه برابر زنان بـاردار غیـر سـیگاری است** (۱۰).

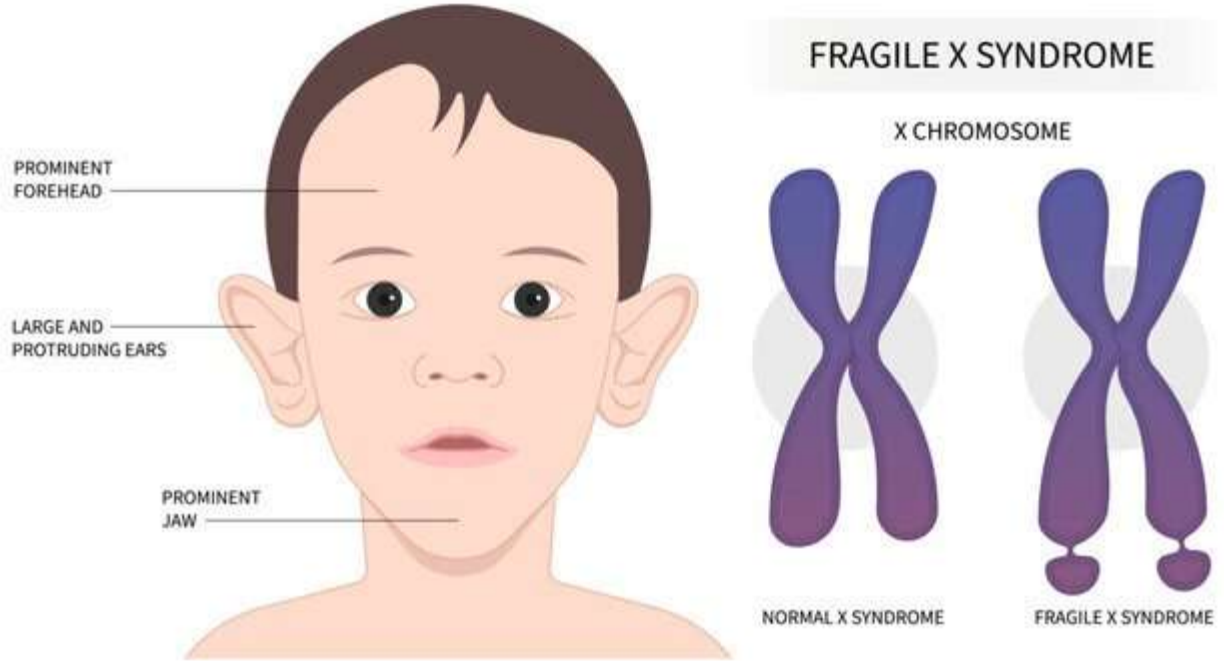
کاربردهای بالینی cffDNA عبارتند از:



اختلالات مرتبط با کروموزوم X

سر دسته این اختلالات عبارتند از سندرم X شکننده، دیستروفی عضلانی دوشن، و هموفیلی می باشد. یعنی اگر مادری ناقل یک بیماری وابسته به کروموزوم باشد امکان انتقال آن را به به جنین پسر دارد و امکان بروز بیماری در پسران وی وجود دارد.

بنابراین اگر در این روش به تشخیص سریعتر جنین پسر برسیم می توانیم مشاوره ژنتیک و در صورت لزوم تست های ژنتیکی مورد نیاز را طراحی نماییم.



تعیین جنس جنین

اولین کاربرد cffDNA تعیین جنس جنین است که از طریق آشکار شـدن **ژن‌های موجود بر روی کروموزم Y جنین‌های مذکر** مشخص می‌شود. برای تعیین جـنس جنـین از ژن SRY به عنوان مارکر DNA جنینی جنس مذکر استفاده می‌شود. این تست بـرای بررسـی خطر بروز اختلالات جنسی وابسته به X، تشخیص مبهم بـودن ژنیتـال و مـدیریت شـرایط متابولیک کاربرد دارد و از هفته پنجم به بعد انجام می‌شود. فاکتورهایی که بیشترین تـأثیر را در نتیجه تست دارند عبارتند از سن بـارداری و روش تکثیـر DNA. چنـدین مطالعـه در هفته‌های پنجم و هفتم بارداری با کمک Real-Time PCR انجام شده که میزان حساسیت آن را ۱۰۰٪ نشان داده‌اند (۱۱).



تشخیص نوع RhD

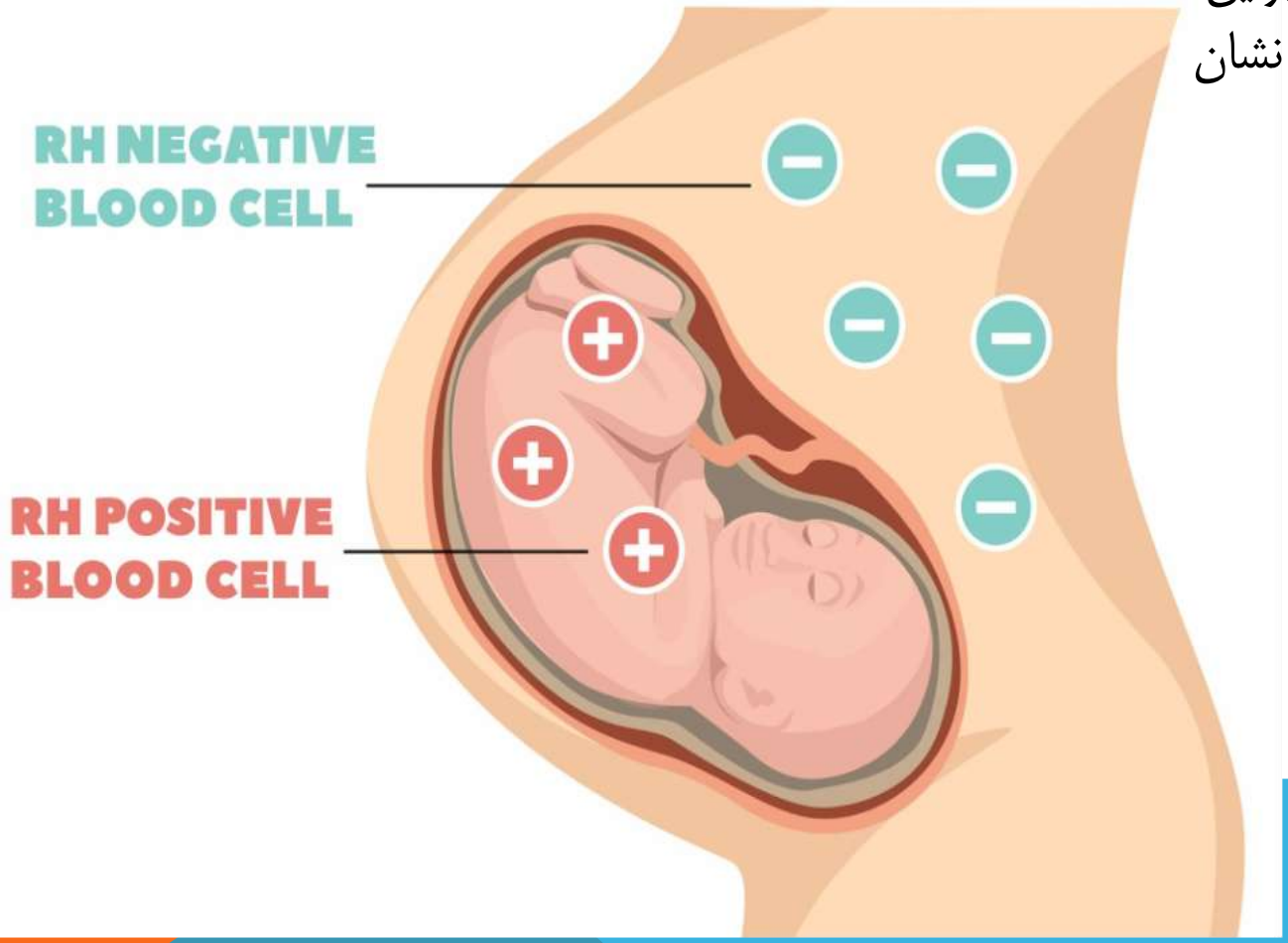
زنان بارداری که گروه خونی رزوس (RhD) منفی دارند، ممکن است حامل جنین RhD مثبت باشند. وجود سلول های RhD مثبت جنین در گردش خون مادر می تواند باعث شود مادری که RhD منفی دارد، آنتی بادی های ضد D علیه آنتی ژن RhD تولید کند. این فرآیند که حساسیت نامیده می‌شود، می‌تواند در هر زمانی از بارداری اتفاق بیفتد، اگرچه در سه ماهه سوم بارداری و در هنگام زایمان شایع‌تر است.

حساسیت می تواند به دنبال رویدادهایی در بارداری باشد که با خونریزی جنین–مادر مرتبط است. فرآیند حساسیت به خودی خود هیچ اثر نامطلوبی برای مادر ندارد و معمولاً بر بارداری که در آن رخ می دهد تأثیر نمی گذارد.

با این حال، در بارداری بعدی با جنین RhD مثبت در زنانی که به آنتی ژن RhD حساس شده اند، آنتی بادی های ضد D زن ممکن است به وجود خون RhD مثبت در جنین پاسخ دهند و در نتیجه بیماری همولیتیک جنین ایجاد شود و نوزاد تازه متولد شده این می تواند باعث کم خونی شدید جنین شود که ممکن است منجر به نارسایی قلب جنین، احتباس مایعات و تورم و مرگ داخل رحمی شود.

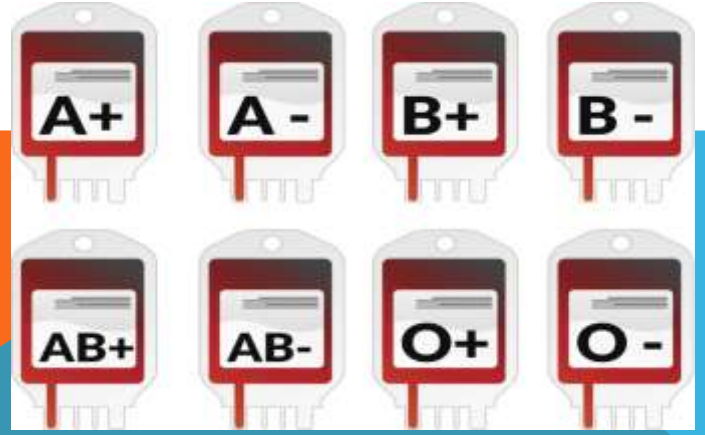
تشخیص نوع RhD

مادری که RhD منفی دارد کپی ژن RhD ندارد. بنابراین، وجود یک ژن RhD در یک زن باردار RhD منفی نشان دهنده وجود جنین RhD مثبت است



تشخیص نوع RhD

برای پیشگیری از بروز بیماری‌های همولیتیک باید وضعیت RhD جنین و مادر مشخص شود. روش‌های سنتی تشخیص وضعیت RhD مشتمل بر تکثیر ژن RhD در مایع آمنیوتیک و آزمایش سرولوژی در بدو تولد می‌باشد. برای تشخیص وضعیت RhD جنین به کمک cffDNA از **دو منطقه‌ی ژن RhD (اگزون ۵ و ۷) استفاده می‌شود.** دلایل نتایج منفی کاذب این تست؛ عبارتند از: کمبود DNA جنینی موجود در پلاسمای مادر، علل بیولوژیکی (انجام تست در اوایل دوران بارداری) و علل تکنیکی (استخراج ضعیف DNA) (۱۲).



تشخیص آنوپلوئیدی جنین

آنوپلوئیدی علت اصلی نقص تولیدمثل و بیماری‌های مادرزادی همراه با اختلال کروموزومی مثل تریزومی ۲۱ (سندرم داون)، تریزومی ۱۸ (سندرم ادروارد)، تریزومی ۱۳ (سندرم پاتو)، سندرم کلاین‌فلتر (XXY) و سندرم ترنر (XO)، می‌باشد.

همانطور که اشاره شد رایج‌ترین تکنیک‌های تشخیص آنوپلوئیدی قبل از تولد CVS و آمنیوسنتز هستند که هر دو از روش‌های تهاجمی محسوب می‌شوند. جدیدترین تکنیک برای تشخیص آنوپلوئیدی، ارزیابی مقادیر نسبی کروموزوم هدف (مثلاً ۲۱) با تکنیک Real-Time PCR است.

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که میزان cffDNA در شرایط آنوپلوئیدی افزایش می‌یابد. Lo و همکاران نشان دادند که به واسطه cffDNA موجود در پلاسمای مادر، می‌توان جنین دارای تریزومی ۲۱ را با حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت ۹۷/۹٪ تشخیص داد.

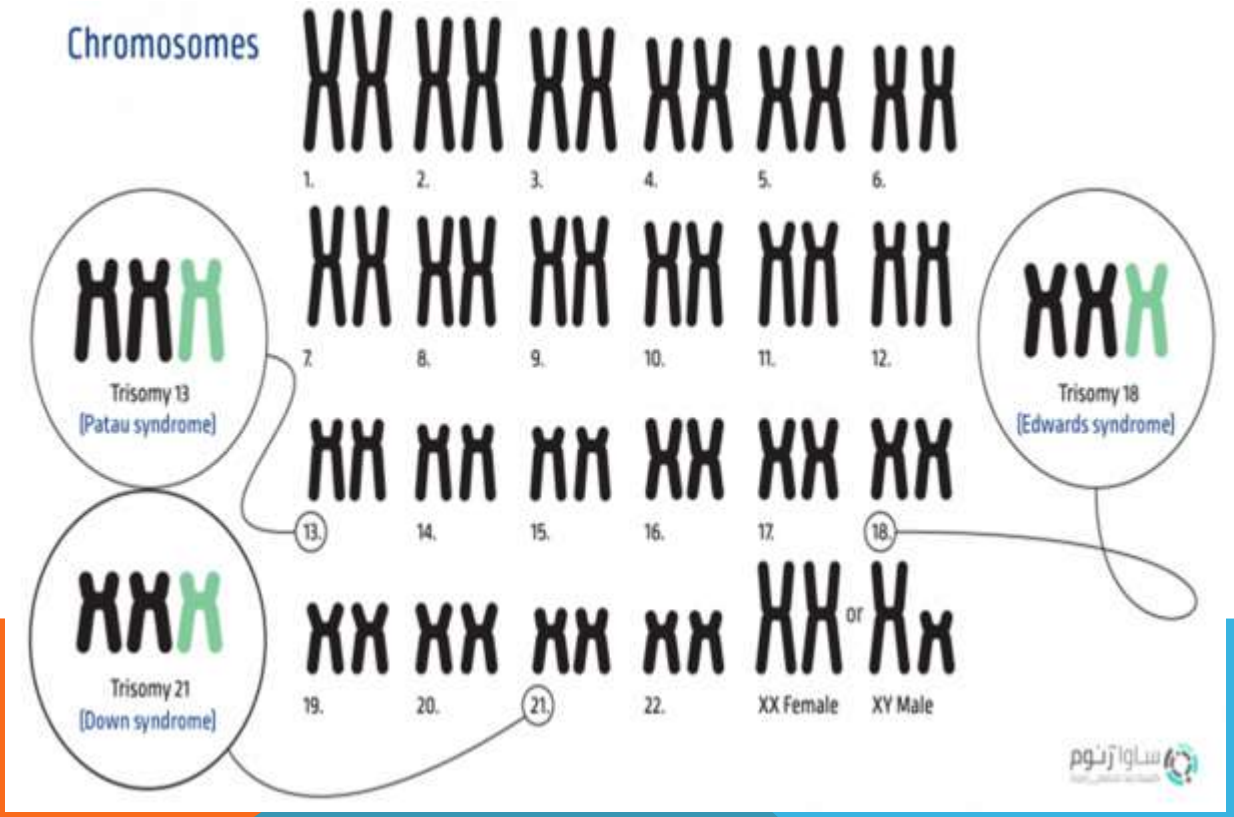
تشخیص آنوپلوئیدی جنین

بر اساس اطلاعات بدست آمده طی ۸ مطالعه تا سال ۲۰۱۲، cffDNA از نظر وضعیت آنوپلوئیدی غربالگری شد. در پنج مورد از مطالعات مذکور از تکنیک MPSS و در بقیه از تکنیک DANSR استفاده گردید. همچنین هر ۸ مطالعه تریزومی ۲۱، ۶ مطالعه تریزومی ۱۸ و دو مطالعه نیز تریزومی ۱۳ را بررسی کردند. به عنوان مثال در مطالعه Norton و همکاران که بر روی ۳۲۲۸ زن باردار انجام شد نشان داده که حساسیت روش DANSR برای غربالگری تریزومی ۲۱ (سندرم داون)، ۱۰۰٪ و برای غربالگری تریزومی ۱۸ (سندرم ادوارد)، ۹۷٪ است. در همه این مطالعات وضعیت صحیح کروموزومی بوسیله CVS یا آمنیوسنتز تأیید شد (۱۳).

تشخیص آنوپلوئیدی جنین

به طور کلی تمرکز برنامه های غربالگری در دوران بارداری بر روی تشخیص سندرم داون و دو آنوپلوئیدی اتوزومال دیگر که کمتر شایع هستند یعنی تریزومی ۱۸ و ۱۳ است. **تریزومی ۲۱ شایع ترین آنوپلوئیدی در انسان با شیوع تقریبا ۱ در ۸۰۰ است.**

ریسک ابتلای جنین به سندرم داون با افزایش سن زیاد می شود به طوری که حدودا یک خانم ۴۵ ساله دارای ریسک ۱ به ۳۵ است.



تشخیص آنوپلوئیدی جنین

Patient Details			
Patient ID	N01-6265(171825)	Clinician Name	
Patient Name		Hospital/Clinic Name	
Date of Blood Draw		Pregnancy Status Singleton/Twin	singleton
Patient Date of Birth		Report Generated	
TIID	-	Gestational Age	13weeks+6days

I. Screening results

Chromosomes	Risk	Z score	Test Results	Reference interval
Chromosome 21		-1.00	Low Risk	-6<Z score<2.8
Chromosome 18		-2.00	Low Risk	-6<Z score<2.8
Chromosome 13		-0.58	Low Risk	-6<Z score<2.8
Chromosome Y	-		-	NA
Sex Chromosomes		Part III	-	Part III

Fetal fraction
5%

II. Supplementary information



تعیین اختلالات تک‌ژنی

بیماری‌هایی مثل **آکندروپلازی، هانتینگتون، دیستروفی عضلانی، هیپرپلازی مادرزادی آدرنال، هموفیلی و β- تالاسمی** به دلیل جهش‌های تک‌نقطه‌ای ایجاد می‌شوند و برای تشخیص آنها می‌توان ژن‌های جهش‌یافته را در خون مادر شناسایی کرد. بیماری آکندروپلازی در اثر جهش نقطه‌ای در ژن FGFR3 ایجاد می‌شود. در مطالعه‌ای که در آن از cffDNA استفاده شد، در بیش از ۹۸٪ موارد، این بیماری تشخیص داده شد. به کمک cffDNA می‌توان **بیماری هانتینگتون** را در حدود هفته دهم بارداری با صحت بسیار بالا تشخیص داد. رایج‌ترین علت بیماری β- تالاسمی جهش در ژن CTTT می‌باشد که می‌توان به کمک PCR این جهش را با حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت بالا شناسایی نمود.

تعیین اختلالات تک‌ژنی

اختلالات تک ژنی زمینه دیگری است که NIPT ممکن است در آن اعمال شود، به ویژه برای زوج هایی که جنین در معرض خطر بیماری تک ژنی ارثی هستند. استراتژی‌های مختلف NIPT باید بر اساس الگوی وراثتی بیماری خاص (به عنوان مثال اتوزومال غالب، اتوزومال مغلوب و وابسته به X) و با توجه به اینکه آیا وراثت پدری یا مادری هست باید ارزیابی شود، ابداع می شود. NIPT اختلالات تک ژنی شامل دو مرحله اصلی است:

۱) بازسازی هاپلوتیپ های والدین

۲) تعیین توالی پلاسمای مادر و به دنبال آن کسر ژنوتیپ جنین.

اختلالات تک ژنی قابل ارزیابی به وسیله تکنیکNIPT

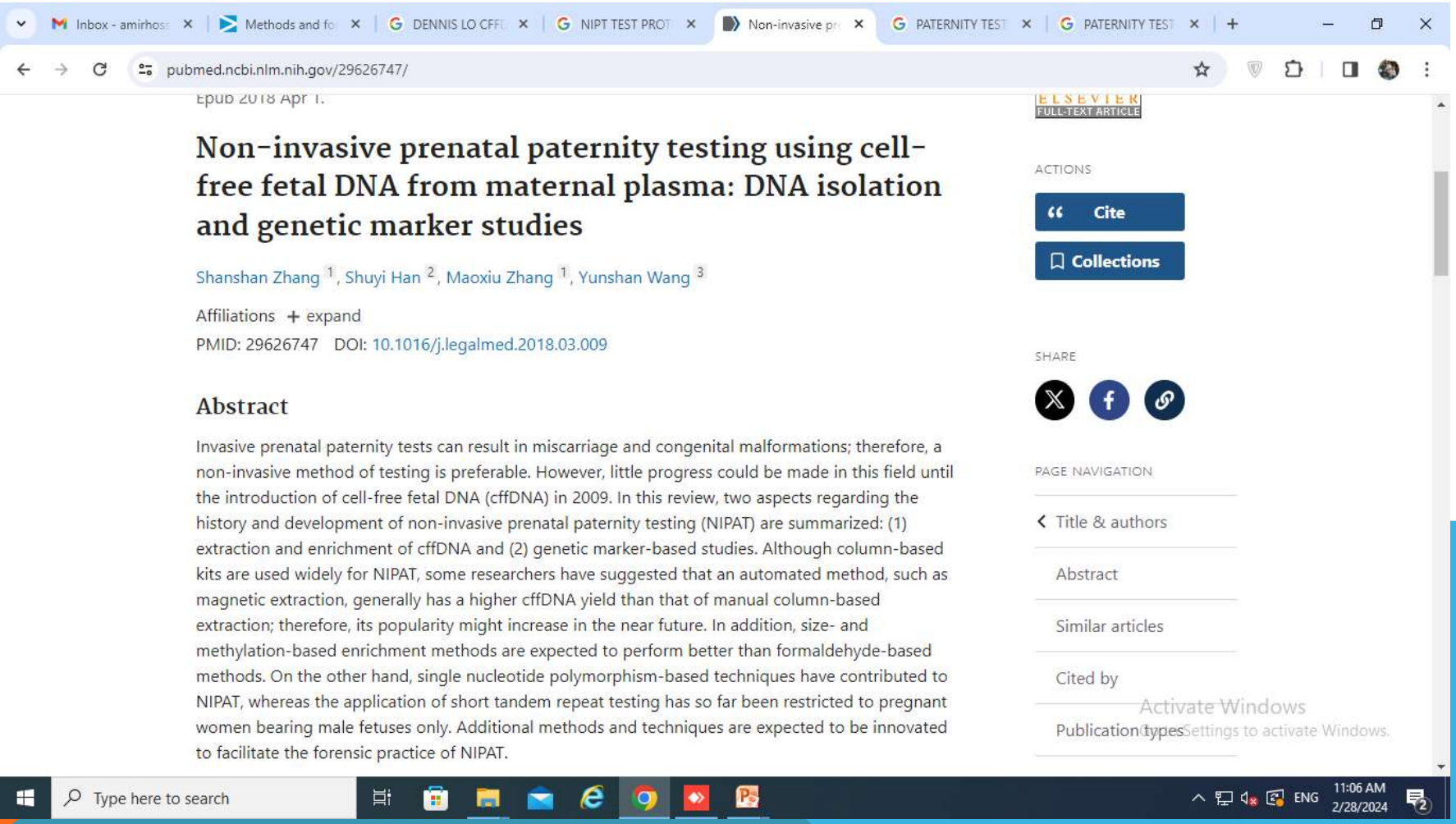
Table 1 List of NIPD for single gene disorders publications

Monogenic disorder	Approach to NIPD
Paternally inherited or de novo autosomal dominant disorders	
Achondroplasia Apert syndrome Early onset primary dystonia I Thanatophoric dysplasia	▶ Detection or exclusion of paternal or de novo allele reported as diagnostic. ▶ Technologies used include a variety of PCR approaches, dPCR and NGS
Huntington's disease	Not fully accurate. Invasive testing recommended for diagnosis
Autosomal recessive conditions where parents carry different altered alleles	
α-thalassaemia β-thalassaemia CAH Cystic fibrosis Leber congenital amaurosis Propionic acidemia Frasers syndrome Autosomal recessive polycystic kidney disease	▶ Exclusion of paternal allele reduces risk to zero. ▶ Detection of the paternal allele indicates an increased risk (to 50%) and invasive testing is required for definitive diagnosis. ▶ Technologies used include PCR, dPCR and NGS have been reported
Autosomal recessive conditions where parents carry the same altered allele	
Sickle cell anaemia β-thalassaemia	Estimation of allelic ratios required, so accurate estimation of fetal fraction needed. Currently can only be done using dPCR[19] or NGS.[20 21] Limited application in female fetuses as there is no reliable universal fetal DNA marker available. Y-chromosome sequences can be used in male-bearing pregnancies
X-linked conditions	
Haemophilia	Estimation of allelic ratios required, so accurate estimation of fetal fraction required using Y-chromosome sequences.[22]

CAH, congenital adrenal hyperplasia; NGS, next-generation sequencing; NIPD, non-invasive prenatal diagnosis.

تعیین ابوّت

تعیین ابوّت جنین به کمک **سیستم ژنوتیپی DNA- STR امکان‌پذیر است**. DNA- STR آلل‌های چندگانه دارد و می‌تواند تنوع بسیار بالایی داشته باشد (۱۱).



تست NIPT در تشخیص حاملگی دوقلویی

در ایالات متحده، در سال ۲۰۱۸، تقریباً یک مورد از هر ۳۳ تولد حاصل دوقلویی بوده است. حاملگی های چند جنینی در معرض خطر طیف وسیعی از عوارض حاملگی و پیامد های نامطلوب قرار دارند.
مشابه تک قلوها، زنان دارای چندقلوها دارای cff-DNA مشتق از تروفوبلاست ها در گردش خون مادر خود هستند (که معمولاً به عنوان DNA جنینی نامیده می شود).
به عنوان یک نشانگر زیستی، cff-DNA جنین دارای یک مزیت نظری ذاتی نسبت به آزمایش‌های معمولی مبتنی بر سرم مادر است، زیرا بازتاب مستقیم ژنوتیپ مفهومی را فراهم می‌کند و می‌توان آن را از طریق فناوری‌های مولکولی بسیار قدرتمند مانند PCR و توالی‌یابی ارزیابی کرد.

تست NIPT در تشخیص حاملگی دوقلویی

تجزیه و تحلیل پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs) در cff-DNA امکان تمایز بین توالی های مادر و جنین را فراهم می کند. در حاملگی دو تخمکی دوقلو، SNPها همچنین می توانند امکان ارزیابی cff-DNA را از هر جنین جداگانه فراهم کنند.

این می تواند به عنوان یک جزء تحلیلی جداگانه در ارزیابی کلی زیگوسیته و آنیوپلوئیدی باشد.

حساسیت و اختصاصیت تست NIPT در تشخیص تریزومی ۲۱ و آنیوپلوئیدی کروموزوم جنسی در حاملگی های دوقلویی ۱۰۰ و ۹۹/۹ درصد است که این حساسیت و اختصاصیت بالا نیاز به آزمایشات تهاجمی را کاهش می دهد.

تست NIPT در تشخیص حاملگی دوقلویی

تست NIPT در حاملگی دوقلویی می تواند DNA هر کدام از جنین ها را به طور جدا گانه مشخص کند یعنی می تواند به ما بگوید

- دوقلو ها همسان هستند (از یک تخمک) یا غیر همسان (از دو تخمک جدا گانه)
- جنسیت هر دوقلو (۲ دختر، ۲ پسر، یا ۱ دختر و ۱ پسر!)



تست NIPT در تشخیص حاملگی دوقلویی

تست غیر تهاجمی قبل از تولد (NIPT) برای تعیین جنسیت جنین در حاملگی های تک قلو دقیق است، اما دقت آن در حاملگی های دوقلو به خوبی ثابت نشده است.
در مطالعه گذشته نگر که با استفاده از مجموع ۱۹۸ بارداری دوقلو با جنسیت مشخص انجام شد مشخص گردید که زمانی که یک یا هر دو، دوقلوها مذکرهستند اختصاصیت و حساسیت این تست ۱۰۰درصد هست اما زمانی که هر دو قل مونث باشند حساسیت این تست ۹۸ درصد و اختصاصیت آن ۹۵ درصد می باشد.



نتایج مثبت کاذب در تست NIPT

بررسی ها نشان داده است که در واقع DNA که در این روش مورد بررسی قرار می گیرد DNA جنین نبوده بلکه DNA جفتی می باشد.

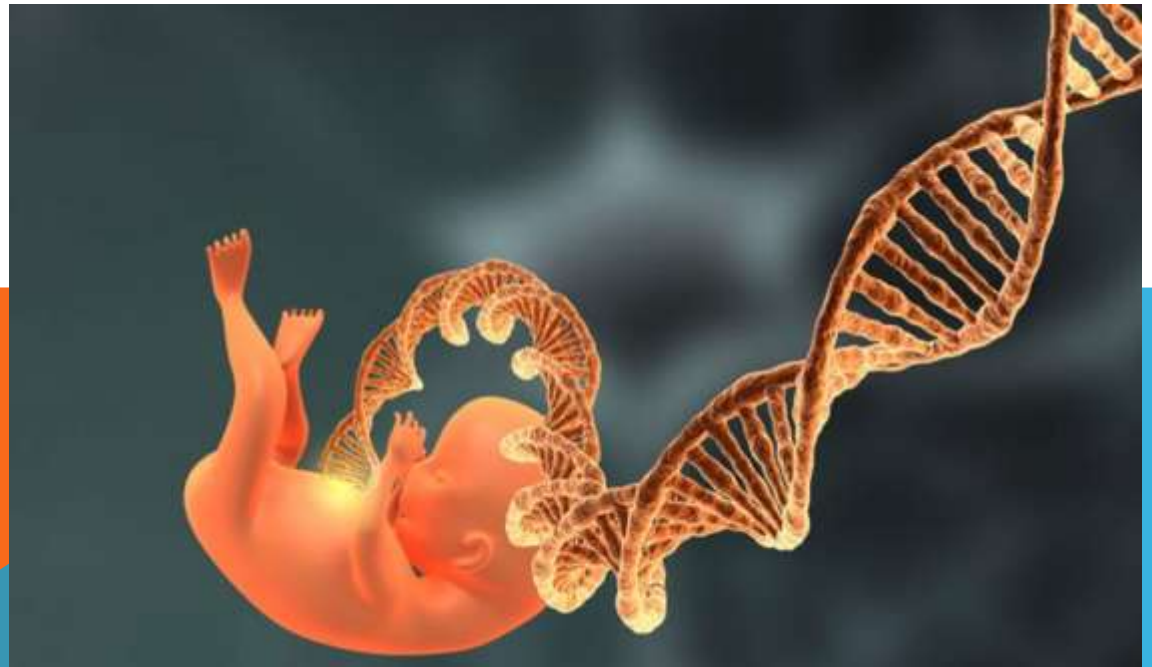
بر اساس یافته های علم جنین شناسی گامت (تخم) تشکیل شده، در عرض ۲ روز پس از لقاح و تشکیل تخم، تخم سفر خود را از طریق لوله رحمی به سمت رحم آغاز می کنند که این امر با فعالیت عضلات جدار لوله میسر می شود. در همین زمان، تخم خود را مکرراً تقسیم می کند تا مجموعه ای از سلول ها (بلاستومرها) به نام مورولا حاصل شود.

تقسیم سلول های در حال عبور از لوله حمل تخمک ادامه یافته بطوریکه تعداد آنها هر ۱۲ ساعت دو برابر می شود. وقتی مجموعه سلولی فوق به رحم می رسد، شامل صدها سلول است. پس از ۶ تا ۱۲ روز (متوسط ۹ روز) این مجموعه سلول به رحم می رسد و در لایه آندومتر لانه‌گزینی آغاز و شروع به تقسیم سلولی می‌کند.

نتایج مثبت کاذب در تست NIPT

در اولین تقسیمات سلولی یک سری سلول‌های متفاوت که در آینده عملکرد مختلفی دارند تشکیل می‌شوند:

- یک سری سلولها جنین را تشکیل می دهد.
- یک سری سلولها در آینده جفت را تشکیل داده و به آن سیتوتروفوبلاست (Cytotrophoblast) می گویند.
- یک سری سلولها هم به صورت یک لنگر باعث اتصال جنین و جفت به جدار رحمی مادر می شود که به آن سلولهای سن سیتیوتروفوبلاست (Syncytiotrophoblast) می گویند.



نتایج مثبت کاذب در تست NIPT

تقریباً تمام cffDNA که در خون مادر دیده می شود، در واقع منشاء آن از سلولهای جفت بوده و نه جنین و بهتر است به آن cell free placental DNA بگوئیم.

به همین دلیل در مواقعی که موزائیسم جفتی وجود دارد (confined placental mosaicism)، زمانی که سه تایی شدن کروموزوم در بعضی سلولهای تشکیل دهنده جفت دیده می شود، در حالیکه سلولهای دیگر از جمله سلولهای جنین نرمال هستند سبب مشاهده نتیجه مثبت کاذب می شود و در نتیجه برای تأئید تشخیص نیاز به آمنیوسنتز داریم.

هرچند cffDNA ممکن است متمایز از cell free placental DNA باشد اما در قسمت اعظم موارد، صحت نتایج آن بسیار خوب است، در حالی‌که توجه به تفاوت مفهومی بین این دو اصطلاح ضروری است.

به همین دلیل است که این تست هرچند صحت بالایی دارد ولی در هنگام مثبت شدن نتیجه تست، قدرت کافی برای تصمیم گیری بدون انجام تست های تشخیصی مثل آمنیوسنتز را ندارد.

نتایج مثبت کاذب در تست NIPT

- علل مشاهده نتایج مثبت کاذب (جواب تست NIPT مثبت در حالیکه در آمنیوسنتز جنین سالم است)

۱- Confined Placental Mosaicism

سه‌تایی شدن کروموزوم در بعضی سلول‌های تشکیل دهنده جفت صورت می گیرد در حالیکه سلول‌های دیگر از جمله سلول‌های جنین نرمال می‌باشند، این حالت در ۲-۱٪ بارداری‌ها دیده می‌شود و در نتیجه وضعیتی تقریباً شایع است.

۲- Vanishing twins

وجود یک قل تحلیل رفته که باعث آزاد شدن کروموزوم های اضافی می شود (فاصله بین مرگ قل دوم و خونگیری حداقل ۸ هفته باشد و ساک حاملگی مربوط به قل سقط شده خالی می باشد).

نتایج مثبت کاذب در تست NIPT

۳- Maternal Malignancy (maternal copy number variation = CNV)

بدلیل وجود یک سری کپی نامبرهای غیرطبیعی مترشحه از سلولهای توموری که به آن maternal copy number variation = CNV می گویند

۴- از علل دیگر مثبت کاذب مواردی مثل **تزریق خون یا فرآورده های خونی طی یک سال گذشته، انجام پیوند مغز استخوان** و به طور کلی هر موقع منشا سومی از کروموزوم ها وجود داشته باشد می تواند در نتیجه تست تاثیر بگذارد.

نتایج منفی کاذب در تست NIPT

❖علل مشاهده موارد منفی کاذب (جواب تست NIPT منفی در حالیکه در آمنیوسنتز جنین ناهنجاری دارد)

۱- جنین تریپلوئید: بدلیل آنکه تمام کروموزوم ها سه تا شده اند این تست در هنگام محاسبه نسبت کروموزوم ۲۱ به کروموزوم های پایه این نسبت را ۱ به ۱ محاسبه و بعنوان جنین سالم گزارش می کند.

۲- موزائیسم واقعی جنینی (True fetal mosaicism): در این موارد بعضی از بافت های جنین به صورت موزائیسم شامل سلولهای نرمال و هم آنوپلوئید می باشد در حالیکه جفت سالم است و سلول های دارای موزائیسم در تروفوبلاست وجود نداشته ولی در جنین وجود دارند. میزان بروز این پدیده ۱:۱۰۷ می باشد.

علل مشاهده موارد عدم جواب دهی تست NIPT (Not Reported)

۱- اگر تست قبل از هفته دهم بارداری به دلیل کاهش Fetal fraction انجام شود

۲- مصرف برخی از ترکیبات ضد انعقادی نظیرEnoxaparin، آسپرین و یا هپارین از طریق کاهش دادن فرآیند ترومبوز جفتی، کاهش هایپوکسی و کاهش التهاب در ناحیه جفت و در نهایت باعث کاهش فرآیند آپوپتوز و کاهش سطح Fetal Fraction

۳- زنان با وزن بالای ۱۰۰ کیلوگرم و BMI (شاخص توده بدنی) بالای ۳۲

۴- وجود فاکتور رقت (Dilution effect)

۵- بالا بودن Adipocyte turnover در زنان چاق که سبب افزایش فرآیند دژنره شدن cffDNA می شود.

مزایای تست NIPT نسبت به سایر تست های غربالگری

۱-مثبت کاذب کمتر: احتمال مثبت کاذب این تست زیر یک درصد برای تریزومی های ۲۱، ۱۸ و ۱۳ است.

۲-قدرت تشخیص بالاتر: قدرت تشخیص به بالای ۹۹ درصد برای اختلالات کروموزوم های ۲۱، ۱۸ و ۱۳ می رسد.

۳-صحت بالای تعیین جنسیت: قدرت تشخیص جنسیت در این روش بالای ۹۷٪ است که نسبت به بسیاری از تست های مشابه خود بالاتر است.

۴-عدم وجود احتمال سقط جنین: بر خلاف روش های تشخیصی تهاجمی، به دلیل آنکه این تست فقط بر روی خون مادر انجام می شود، هیچ گونه ریسکی برای ایجاد سقط جنین ندارد.

۵-عدم تاثیر پذیری از بارداری های قبلی: از آنجائیکه نیمه عمر cffDNA کمتر از ۲ ساعت است بنابراین بارداری های قبلی اختلالی در نتیجه تست ایجاد نمی کند.

۶-تشخیص زود هنگام: این تست از هفته ۱۰ بارداری قابل انجام است.

۷-جوابدهی سریع و بهترین پروتکل غربالگری بعد از هفته ۲۲ بارداری

کاربرد تست NIPT در آینده

آزمایش غیر تهاجمی قبل از تولد (NIPT) در خط مقدم غربالگری قبل از تولد است. کاربردهـای فعلـی NIPT شامل تعیین جنسیت جنین و غربالگری اختلالات کروموزومی مانند تریزومی ۲۱ (سندرم داون) است. با این حـال، NIPT ممکن است دربسیاری از برنامه های مختلف آینده گسترش یابد.

طبق مطالعات اخیرکه در آن نگرش‌های زنانی را که قبلاً از NIPT استفاده کـرده بودنـد، در مـورد اسـتفاده‌های فعلی و آینده این فناوری مورد بررسی قرارداده. نتایج نشان می دهد که زنان بیشتر به غربالگری پزشکی بـا شـروع زودتر در زندگی علاقه مند هستند. پاسخ دهندگان همچنین در مورد تأثیرتست بر کیفیت زندگی آنها و دقت آزمون بسیار نگران هستند.همچنین نظرات پاسخ دهنـدگان نسـبت بـه در دسـترس بـودن و اسـتفاده از NIPT بـرای تریزومی های ۲۱، ۱۳ و ۱۸ بسیار مطلوب بود .این نتایج می تواند نشانگر استفاده بیشتر از این تست در آینده باشد .

کاربرد تست NIPT در آینده

NIPTیک تکنیک جدید غربالگری در پزشکی است که در سطح جهانی به دلیل کارایی آن مورد تایید قرار گرفته و توسط بسیاری از کشورهای جهان مورد استقبال قرار گرفته است. علی‌رغم محدودیت‌های ذکر شده، NIPT پتانسیل زیادی را برای یک روش غربالگری قابل اعتماد نشان داده است، همانطور که با حساسیت و ویژگی بالای آن برای تشخیص آنوپلوئیدی‌های کروموزومی نشان داده شده است. اگرچه NIPT کاملاً خطاناپذیر نیست، اما از نظر ارائه نتایج دقیق‌تر در تشخیص آنوپلوئیدی‌های کروموزومی، هنوز از روش‌های غربالگری مرسوم فراتر می‌رود.

دولت‌ها، از جمله کشورهای آسیای جنوب شرقی، باید NIPT را برای شناسایی T13، T18، و T21 از طریق برنامه‌های بودجه عمومی برای کاهش نابرابری‌ها در میان زنان با پیشینه‌های اقتصادی-اجتماعی متنوع در نظر بگیرند. در همین حال، شرکت های بیمه سلامت می توانند پوشش آزمایشی را برای کمک به کاهش بار هزینه های خارج از جیب ارائه دهند. ما می توانیم ببینیم که موفقیت بودجه عمومی برای NIPT برای زنان در کشورهای توسعه یافته مانند دانمارک، هلند، فرانسه و سوئیس در ترویج دسترسی برابر به NIPT برای بیماران مفید بوده است. برای افزایش اطلاعات غربالگری قبل از تولد، توصیه می‌شود که پزشکان یا متخصصان ژنتیکی که مسئول مشاوره NIPT هستند، دانش و مهارت کافی داشته باشند تا بتوانند به طور مؤثر فرآیند مشاوره را برای زنان باردار تسهیل کنند. از طریق دسترسی گسترده تر به اطلاعات قابل اعتماد و دسترسی آسان به NIPT، برنامه ها و استراتژی های آینده می توانند جذب NIPT برای غربالگری T13، T18و T21 را افزایش دهند.

تست‌های تجاری موجود برای NIPT

تعدادی از شرکت‌ها مثل Sequenom، Verinata، Ariosa و Natera نسل جدیدی از تست‌های NIPT را طراحی کرده‌اند که همه آنها برای بدست آوردن اطلاعات موجود در cffDNA از روش تعیین توالی استفاده می‌کنند. هر شرکت برای تفسیر داده‌های ژنتیکی از اَلگوریتم مخصوص خود استفاده می‌کند. اگر چه تکنولوژی مورد استفاده این شرکت‌ها متفاوت است ولی کاربرد بالینی همه مشابه است و همگی cfDNA موجود در خون مادر را برای بررسی وجود آنوپلوئیدی آنالیز می‌کنند. میزان تشخیص این کیت‌ها برای تریزومی‌های مختلف متفاوت است؛ به عنوان مثال شرکت Natera تست Panorama را بر اساس SNP طراحی کرده است که می‌تواند تریزومی‌های ۲۱، ۱۸ و ۱۳ را با اختصاصیت ۱۰۰٪ و حساسیت ۹۹-۹۲٪ غربالگری کند (جدول ۱) (۳, ۱۴).

Company	Test	Released	Trisomies Tested	Genetic Testing Method	Accuracy	Sensitivity	Cost
Sequenom	MaterniT21 Plus	February 2012	13, 18, 21, sex chromo-somes	MPSS	>99%	92–99%	$2,762
Verinata	Verifi Prenatal Test	March 2012	13, 18, 21, sex chromo-somes	MPSS	100%	87–99%	$1,500
Aria Diagnostics	Harmony Prenatal Test	May 2012	13, 18, 21	Chromosome-selective sequencing	>99%	80–99%	$795
Natera	Panorama	March 2013	13, 18, 21	Single nucleotide polymorphism	100%	92–99%	$1,495

جدول 1. تست‌های تجاری موجود برای تست NIPT

مراحل انجام تست Panorama

به کمک این تکنیک می‌توان تفاوت ژنتیکی های بین ژنوم مادر و جنین را مشخص نمود.

خون مادر در حدود هفته ۹ بارداری اخذ و پلاسما و بافی‌کوت آن جدا می‌شود.

DNA موجود در پلاسما و بافی-کوت، تکثیر و به کمک دستگاه توالی‌یاب آنالیز می‌شود.

داده‌های حاصل از مرحله قبل به کمک اَلگوریتم NATUS آنالیز می‌شوند. این اَلگوریتم می‌تواند سیگنال ناشی از DNA مادر را از سیگنال ناشی از DNA جنین تمیز دهد.

گزارش حاوی معیار خطر برای کروموزوم‌های ۲۱، ۱۸، ۱۳، X و Y آماده می‌شود.

نتیجه‌گیری

بزرگترین ایراد روش‌های سنتی غربالگری، درصد بالای نتایج مثبت و منفی کاذب و در تست تأئیدی، احتمال سقط جنین به علت تهاجمی بودن روش نمونه‌گیری است، در حالی که با روش NIPT تقریباً همه جنین‌های مبتلا به سندرم داون با مثبت کاذب بسیار پایین شناسایی می‌شوند. برای درک اهمیت این موضوع به این مثال توجه نمایید: کل موارد حاملگی در ایران در سال ۹۲ حدود ۱/۵ میلیون نفر بوده است. در روش‌های سنتی غربالگری برای این تعداد حاملگی، تعداد زنان باردار با نتایج مثبت کاذب حدود ۷۵۰۰۰ نفر تعیین می‌شود ولی با روش NIPT این تعداد تنها ۵۱۰ نفر خواهد بود. به این ترتیب، با توجه به نتایج مثبت کاذب بسیار پایین روش NIPT، سالانه بیش از ۷۴۴۹۰ مورد انجام آزمایش آمنیوسنتز کمتر درخواست می‌شود که هزینه آن به تنهایی معادل ۷۴۵ میلیارد ریال است و چنانچه از این روش استفاده شود، این هزینه به خانواده‌ها تحمیل نمی‌شود. همچنین تعداد موارد سقط جنین ناشی از نمونه‌گیری تهاجمی در روش‌های سنتی غربالگری ۶۰۰ مورد و در روش NIPT تنها ۲۳ مورد می‌باشد؛ یعنی با استفاده از روش NIPT، سالانه جان ۵۷۳ جنین نجات داده می‌شود.

References

1. Wilson R, Langlois S, Johnson J. Mid-trimester amniocentesis fetal loss rate. Journal of obstetrics and gynaecology Canada: *Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada*. 2007;29(7): 586-95.
2. Dodgson J, Martin J, Boswell J, et al. Probable amniotic fluid embolism precipitated by amniocentesis and treated by exchange transfusion. *British medical journal (Clinical research ed).* 1987; 294 (6583):1322.
3. Norwitz ER, Levy B. Noninvasive Prenatal Testing: The Future Is Now. *Reviews in obstetrics and gynecology.* 2013; 6(2):48.
4. Musci TJ, Fairbrother G, Batey A, et al. Non-invasive prenatal testing with cell-free DNA: US physician attitudes toward implementation in clinical practice. *Prenatal diagnosis*. 2013 ;33: 424-428.
5. Lau TK, Chan MK, Salome Lo PSY, et al. Clinical utility of noninvasive fetal trisomy (NIFTY) test-early experience. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2012; 25(10):1856-9.
6. Caroline F W, Hilary B. The use of cell-free nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal dignosis. *Human Reproduction Update*. 2009; 1(15): 139-151.
7. Jiang F, Ren J ,Chen F, et al. Noninvasive Fetal Trisomy (NIFTY) test: an advanced noninvasive prenatal diagnosis methodology for fetal autosomal and sex chromosomal aneuploidies. *BMC medical genomics.* 2012;5(1):57.
8. Wong D, Moturi S, Angkachatchai V, Mueller R, DeSantis G, van den Boom D, et al. Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing. *Clinical Biochemistry*. 2013; 46(12): 1099-104.
9. Wang E, Batey A, Struble C, et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenatal diagnosis*. 2013; 33(7):662-6.
10. Urato AC, Peter I, Canick J, et al. Smoking in pregnancy is associated with increased total maternal serum cell-free DNA levels. *Prenatal diagnosis*. 2008; 28(3):186-90.
11. Ghorbian S. Applications of Cell-Free Fetal DNA in Maternal Serum. *International Journal of Infertility and Fetal Medicine.* 2012; 3(2):33-9.
12. Macher HC, Noguerol P, Medrano-Campillo P, et al. Standardization non-invasive fetal RHD and SRY determination into clinical routine using a new multiplex RT-PCR assay for fetal cell-free DNA in pregnant women plasma: results in clinical benefits and cost saving. *Clinica Chimica Acta.* 2012; 413(3):490-4.
13. Walsh JM, Goldberg JD. Fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing: a technology assessment. *Prenatal diagnosis*. 2013; 33(6):514-520.
14. Agarwal A, Sayres LC, Cho MK, et al. Commercial landscape of noninvasive prenatal testing in the United States. *Prenatal diagnosis*. 2013; 33(6):521-31.