

PrenaTest[®]

Неинвазивная пренатальная молекулярно-генетическая диагностика плода на трисомии 13, 18 и 21 хромосом методом секвенирования нового поколения (NGS) и расчет Z-распределения по ДНК, выделенной из материнской плазмы.

Информация для докторов

Введение

■ Благодаря использованию технологий секвенирования нового поколения можно с высокой достоверностью обнаружить наиболее распространённые аутосомные трисомии (21, 18 и 13 хромосом) неинвазивным молекулярно-генетическим методом Пренатест по крови матери. Пренатест является неинвазивной молекулярно-генетической диагностикой,

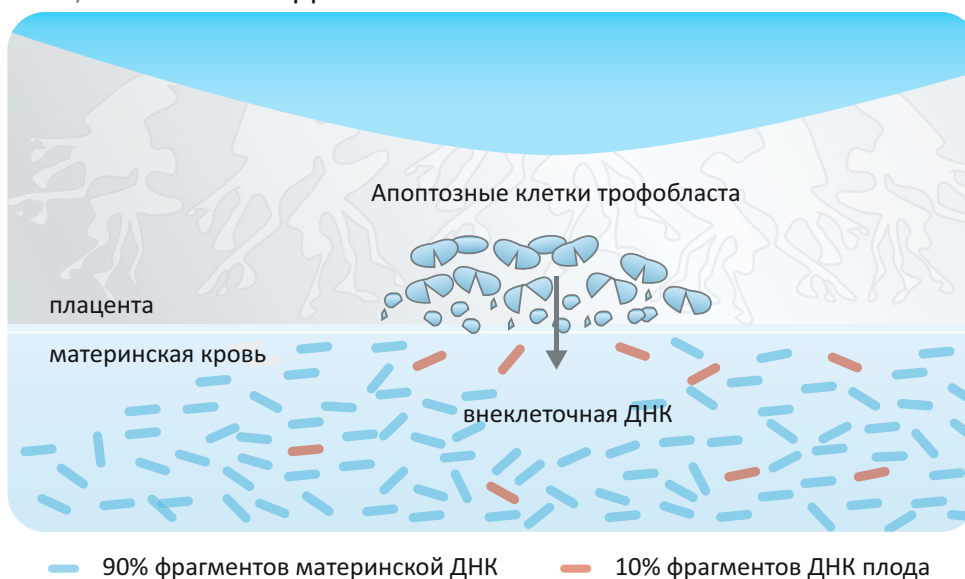
которая дополняет традиционные пренатальные методы исследования. В отличие от инвазивных методов, таких как биопсия ворсин хориона, Пренатест не несет риск связанный с потерей плода. Пренатест предназначен для беременных на сроке 12 недель или более с повышенным риском трисомии плода 13, 18, 21 хромосом.

Научное Обоснование

Метод Пренатест основан на анализе свободноплавающей внеклеточной ДНК (вкДНК) в крови беременной женщины. Эти небольшие фрагменты генетического материала содержатся вне клеток и свободно циркулируют в крови матери. Они состоят из материнской ДНК и 2- 40%

(в среднем около 10%) ДНК плода. Генетический материал плода высвобождается из клеток плаценты и попадает в кровоток беременной женщины. Этот процесс происходит постоянно начиная с 12 недели беременности (рис. 1).

Рисунок 1 Источник вкДНК



Продолжительность жизни свободно плавающих фрагментов ДНК до двух часов и в течение нескольких часов после рождения ребенка, после вкДНК плода больше не обнаруживается в крови матери.

Пренатест определяет, содержит ли кровь беременной женщины генетический материал конкретной хромосомы плода (вкДНК), повышенный уровень которого, указывает на соответствующую трисомию.

Пренатальные тесты, основанные на этом методе, называются неинвазивной пренатальной диагностикой НИПД.

Пример расчета, иллюстрирующий пропорциональные отношения

К примеру, образец плазмы беременной женщины с нормальным набором хромосом у плода содержит 100 фрагментов 21 хромосомы, из них приблизительно 90 фрагментов материнской ДНК и 10 фрагментов ДНК плода.

Тогда как образец плазмы беременной женщины с трисомией 21 хромосомы у плода содержит 105 фрагментов ДНК, 90 от матери и 15 фрагментов от плода.

В Пренатесте это рассчитывается с абсолютной точностью.

Для кого предназначен Пренатест?

Показания к назначению

Утверждения национальных и международных научных ассоциаций

Национальные и международные гинекологические и пренатально-диагностические ассоциации (смотрите вставку) подтверждают, что неинвазивная пренатальная диагностика (НИПД) является передовым методом неинвазивного тестирования с высокой точностью.

Тем не менее, данный метод в настоящее время классифицируется как «неполная диагностика». Кроме того, его не должны использовать вместо УЗИ в первом триместре с измерением воротникового пространства (ВП), так как утолщение ВП может также указывать на наличие других хромосомных aberrаций или пороков развития плода. НИПД всегда должна выполняться в комплексной диагностике и консультировании.

Научные ассоциации предлагают рассматривать технологию НИПД в качестве альтернативы инвазивной диагностике беременных женщин на риск трисомий плода.

Например, по протоколу Фетального Медицинского Фонда (ФМФ) Великобритании в настоящее время рекомендуется инвазивная диагностика беременным женщинам с уровнем риска 1: 300 или выше по результатам скрининга первого триместра. Медицинский Фонд Германии устанавливает группу риска 1: 150 или выше, а также определяет промежуточный диапазон риска от 1: 500 до 1: 151, для которых дополнительно рекомендуется проведение УЗИ во втором триместре для выявления возможных аномалий.

Следовательно, применение НИПД для беременных женщин с повышенным риском может использоваться для замены инвазивных процедур, без риска потери плода.

Нормативные требования к неинвазивной пренатальной диагностике (НИПД) анеуплоидий в Европе

Неинвазивная пренатальная диагностика (НИПД) анеуплоидий для трисомии 21 подпадает под Директивы Европейского союза по лабораторной диагностике 98/79 / EG (List B, Appendix II, IVD products) и под соответствующие национальные законы.

Это означает что:

- Система анализа данных должна иметь Европейскую маркировку CE под контролем уполномоченного органа.
- Компания, предлагающая такие тесты должна иметь комплексную систему менеджмента качества (EN ISO 13485).

В настоящее время Пренатест является единственным тестом, который отвечает этим нормативным требованиям, и это делает его единственным методом неинвазивной молекулярно-генетической диагностики по крови матери, которая имеется на рынке согласно директиве Европейского союза по лабораторной диагностике.

Национальные и международные гинекологические и пренатально-диагностические ассоциации

- International Society for Prenatal Diagnosis **ISPD**
- Association of Privately Practising Prenatal Medical Professionals **BVNP** www.bvnp.de
- German Society for Gynaecology and Obstetrics **DGGG** www.dggg.de
- Swiss Society for Gynaecology and Obstetrics **SGGG** www.sggg.ch
- German Human Genetics Society **GfH** www.gfhev.de
- The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics and The Society for Maternal-Fetal Medicine Publications Committee **ACOG** www.acog.org

Процедура анализа Prenatest

1. После того, как беременная пациентка получила генетическое консультирование и предоставила своё согласие, в лаборатории TreeGene (Алматы) производится забор венозной крови с помощью специальных пробирок 2x10 мл (Cell-Free DNA™ BCT by Streck Innovations, Inc.), которые предоставляются лабораторией LifeCodexx.

2. Далее образцы направляются в лабораторию LifeCodexx, Конштанс, Германия.

3. Лабораторное исследование начинается с выделения плазмы крови.

4. Далее внеклеточный генетический материал (вкДНК) экстрагируют из плазмы. Затем анализируют смесь внеклеточной ДНК матери и плода не разделяя их друг от друга. Для анализа смесь должна содержать $\geq 4\%$ внеклеточной ДНК плода. Если ДНК плода составляет менее 4% всей свободно плавающей ДНК, рекомендуется взять новые образцы на более позднем сроке беременности.

5. ДНК выделяется в малых количествах; после определения процента ДНК плода, генерируется так называемая геномная библиотека и далее анализируется.

6. Далее следует секвенирование с использованием высокотехнологичного оборудования (секвенирование ДНК с использованием метода массового параллельного секвенирования (MPS), с помощью оборудования Illumina HiSeq2000 с технологией секвенирования нового поколения).

7. Последовательность анализируется с помощью программного обеспечения PrenaTest® DAP.plus (см стр.8).

В процессе учитывается ряд и других стандартов, например, минимальное и максимальное количество последовательностей или прочтений (10-30 млн).

Чтобы пройти Пренатест, беременной женщине необходимо:

Женщина должна быть на 12 неделе беременности (срок беременности 11 + 0) или более, а также иметь одно из следующих показаний:

- Средний возраст (35 лет и старше)
- Результаты УЗИ плода, указывающие на повышенный риск трисомии 13, 18 или 21
- Результаты пренатального биохимического скрининга в сыворотке не соответствуют норме
- Предыдущая беременность с трисомией 13, 18 или 21 или в семейном анамнезе
- Другие медицинские причины (совместное решение между врачом и пациентом)



Программное обеспечение PrenaTest® DAP.plus

PrenaTest® DAP.plus является специально разработанной системой анализа данных и имеет CE маркировку, программа выполняет первоначальную сортировку сгенерированных последовательностей и по номерам хромосом

(см рис. 3) в соответствии с установленными критериями качества (см рис. 2). После этого она измеряет количество генетического материала 13, 18 и 21 хромосомы (см рис. 4).

Рисунок 2 Сортировка полученных последовательностей

Анализ образца

программа генерирует около 14,8 млн 36 б.п. прочтений (что покрывает около 8% человеческого генома);

из которых около 6,8 млн. прочтений соответствует одной точке на геноме человека (уникальных прочтений)

of which around 5.7 million *reads* fit the human genome exactly, with no deviation (*unique without mismatch*).

из которых около 70 000 принадлежат **хромосоме 21 (1,2%)** при эуплоидном плоде

около 73 000 принадлежит **хромосоме 21 (1,32%)** при трисомии 21 хромосомы

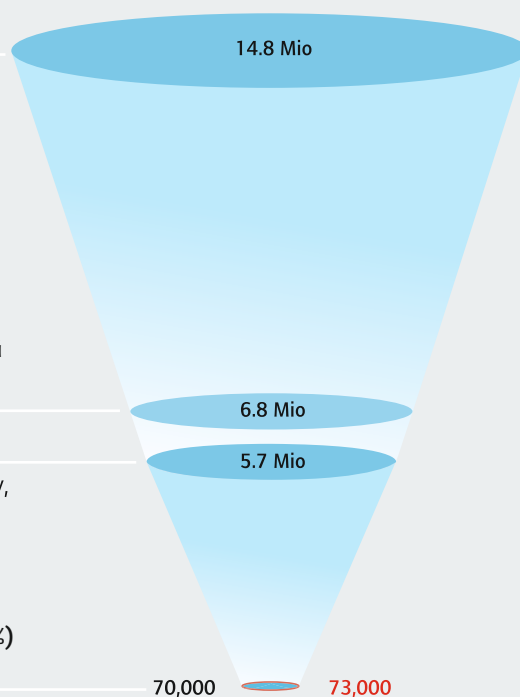


Рисунок 3 Отображение Хромосомы (карта хромосомы)

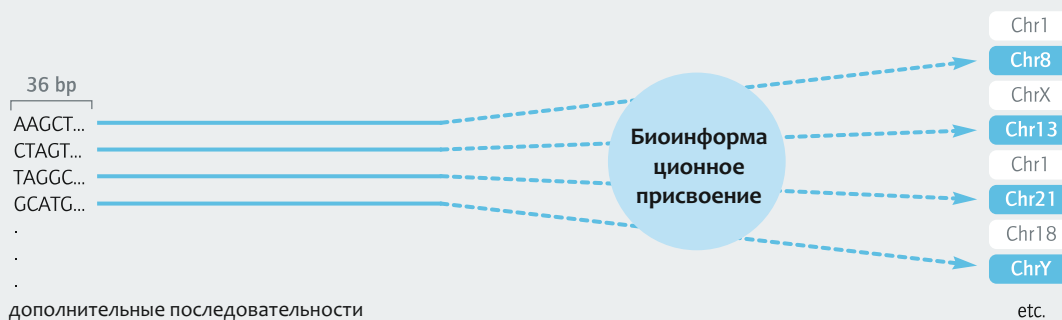


Рисунок 4 Количественное определение

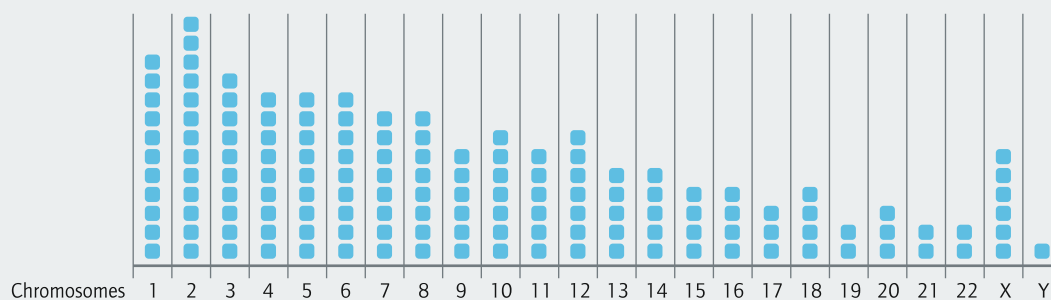


Рисунок 5 Распределение образца по частоте

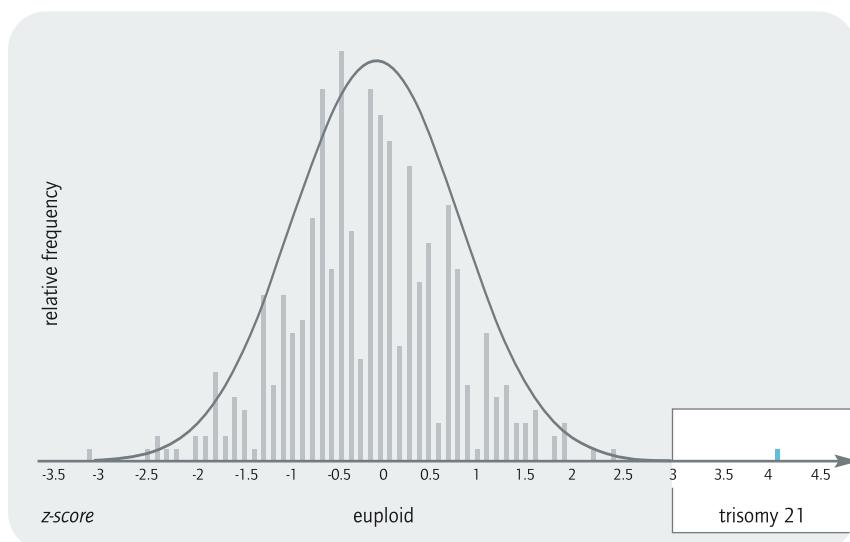
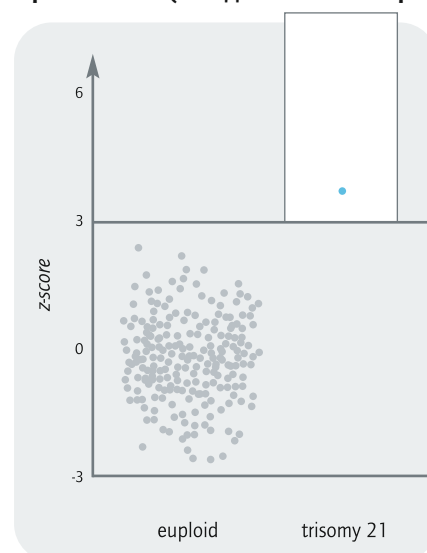


Рисунок 6 Z-распределение нормы и трисомии 21 (в виде точечного графика)



Для исследуемого образца рассчитывается статистическое значение, известное как Z-распределение.

Z-распределение представляет собой процентное соотношение между количеством последовательностей-21 хромосомы в исследуемом образце со средним значением контрольного образца, в рамках среднего абсолютного отклонения (MAD) (см. рис. 5).

Z-распределение рассчитывается по следующей формуле:

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

Z-распределение ниже 3 соответствует нормальному распределению Гаусса и беременности без трисомии 21 (рис. 5).

Z-распределение ≥ 3 означает, что значение превышает средний показатель абсолютного отклонения (MAD), то есть в образце 21-ая хромосома содержится в статистически аномальных количествах - которое, как правило, указывает на наличие трисомии 21.

Для валидации метода и проверки программы Prenatest® DAP.plus было обнаружено 41 случаев трисомии 21 хромосомы, 5 случаев трисомии 13 и 8 случаев трисомии 18.

Достоверность метода

Достоверность Пренатест была оценена путем клинических исследований, в которых лаборатория LifeCodexx принимала непосредственное участие.

В общей сложности было проанализировано 468 образцов крови; из них сорок один случай трисомии 21, восемь случаев трисомии 18 и пять случаев трисомии 13, в общей сложности 466 образцов крови (> 99%) были правильно классифицированы. Один случай трисомии 21 не был обнаружен (ложный отрицательный результат), и один случай трисомии 18 был обнаружен ложно-положительно. Соответственно, чувствительность метода составляет 98,1%, с вероятностью ложно-положительного результата 0,2%.

Свободно плавающая ДНК плода в крови матери происходит от клеток трофобласта, поэтому уровень достоверности исследования сравним с пробой непосредственно из хориона.

Пренатест не позволяет делать выводы в отношении структурных хромосомных aberrаций, метод делает только количественное измерение трисомии 21, 18 и 13.

Чувствительность теста и специфичность метода были статистически выявлены для трисомии 21, в то время как для трисомии 13 и 18 число исследованных образцов недостаточно, чтобы сделать выводы о его чувствительности и специфичности.

В редких случаях, трисомия плода может быть проявлена в виде более мелких структурных aberrаций на хромосоме 21, 18 или 13; такие случаи не могут быть обнаружены с помощью этого молекулярно-генетического метода.

Следовательно, мозаицизм или фетоплацентарное расхождение в трисомиях 21, 18 или 13 не распознаются.

Методом Пренатест не исследуются другие хромосомные аномалии и генетические нарушения, кроме 13, 18, 21.

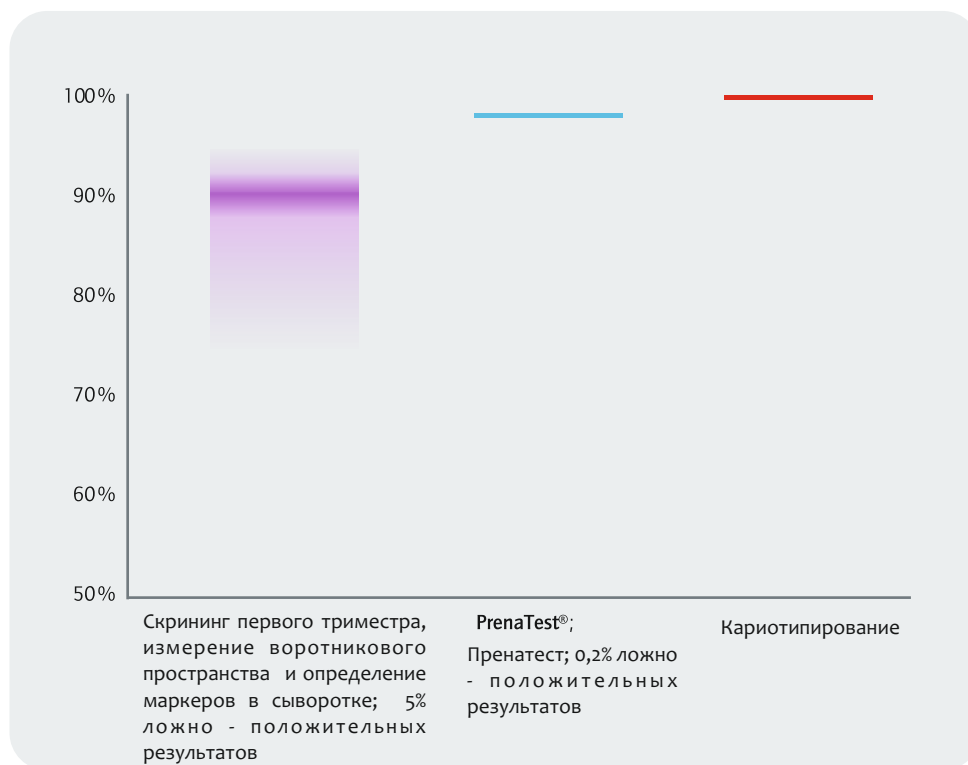


Рисунок 7
Сравнение точности (чувствительности) определения трисомий плода (21, 18 и 13 хромосом) инвазивными и неинвазивными методами исследования.

Где сдать анализ в Казахстане?



Генетическая Лаборатория TreeGene
Казахстан, г. Алматы
ул. Аносова 98



т: +7(727) 391-19-06, 374-35-82
ф: +7(727) 374-34-92



info@tree-gene.com



График работы процедурного кабинета:
Понедельник - Пятница
8.00 - 17.00
(забор крови, мазка и щечного эпителия)



skype:treegene



<https://www.facebook.com/treegene>



- Certified Management System
- EN ISO 13485

