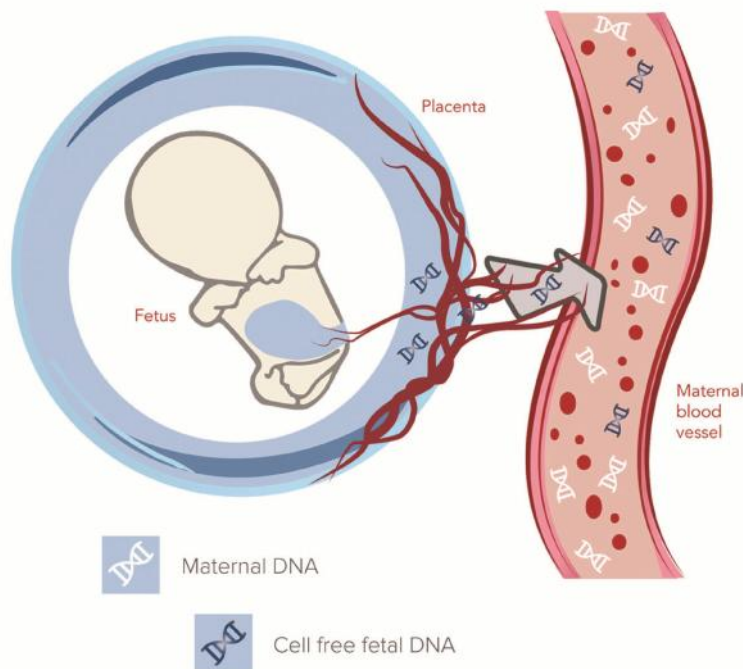


تست غیرتهاجمی تشخیص پیش از تولد

سندرم داون

Non Invasive Fetal Trisomy (NIFTY)

Non Invasive Prenatal Testing (NIPT)



در سال 1997 دانشمندان به وجود DNA جنین در خون زنان باردار پی بردند. این کشف مهم که با ردیابی قسمت هایی از کروموزم Y جنین در سرم مادر توسط Dennis Lo صورت گرفت، اساسی شد برای ظهور روش های غیرتهاجمی تشخیص آنوپلوئیدی ها در دوران بارداری. اصول این روش بر پایه اندازه گیری DNA آزاد در پلاسمای مادر (cell free DNA) است که از سلول های جفت آزاد می شوند. صاحب نظران، این کشف را انقلابی در علوم پرناتولوژی دانسته و پیش بینی می کنند که در آینده نزدیک تست های مبتنی بر آن، جایگزین روش های رایج غربالگری گردد.

روش مولکولی غیرتهاجمی تشخیص آنوپلوئیدی ها

به طور کلی تمرکز برنامه های غربالگری دوران بارداری بر روی تشخیص سندرم داون،⁽¹⁾ NTDs و دو آنوپلوئیدی اتوزومال دیگر که کمتر شایع هستند یعنی تریزومی 18 (سندرم ادوارد) و تریزومی 13 (سندرم Patau) است. سندرم داون یا تریزومی 21 شایع ترین آنوپلوئیدی در انسان با شیوع تقریباً 1 در 800 است. ریسک ابتلای جنین به سندرم داون با افزایش سن زیاد می شود، به طوری که یک خانم 45 ساله دارای ریسک 1 به 35 است. امروزه پیشرفت های علم پزشکی درمان اکثر مشکلات مبتلایان به این سندرم را امکان پذیر ساخته است، به گونه ای که افراد با سندرم داون تا سنین بالا (حدود 55 سالگی) می توانند زندگی کنند.

تریزومی های 18 و 13 نیز مانند سندرم داون در سه ماهه اول و دوم شایع تر از موقع زایمان بوده و به میزان زیادی سقط

خودبه‌خودی در آن‌ها اتفاق می‌افتد. مبتلایان به تریزومی 18 و 13 دارای عمر کوتاه‌مدتی بوده و فقط 5 تا 10 درصد آن‌ها تا یک‌سالگی زنده می‌مانند.

سندرم‌های حذفی Deletion Syndromes

سندرم‌های حذفی به‌عنوان گروهی از اختلالات قابل‌تشخیص بالینی محسوب می‌شوند که به دلیل حذف بخشی از کروموزوم ایجاد می‌شوند. اندازه و محل حذف، ویژگی‌های تظاهرات بالینی و شدت آن‌ها را تعیین می‌کنند. تظاهرات بالینی می‌تواند شامل تأخیرات رشدی، ناتوانی‌های ذهنی، تفاوت‌های رشدی، مشکلات رفتاری، سختی‌های تغذیه‌ای، تون عضلانی پایین، تشنج و دیسمورفی باشد.

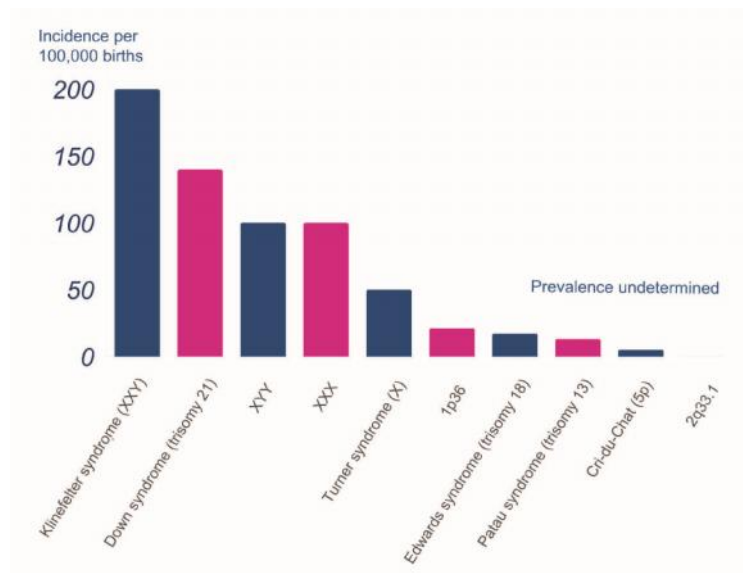
Test Options	
Trisomies	
<input checked="" type="checkbox"/>	Trisomy 21 (Down syndrome)
<input checked="" type="checkbox"/>	Trisomy 18 (Edwards syndrome)
<input checked="" type="checkbox"/>	Trisomy 13 (Patau syndrome)
<input checked="" type="checkbox"/>	Additional Testing Option
<input checked="" type="checkbox"/>	Gender Identification
Trisomies	
<input checked="" type="checkbox"/>	Trisomy 9
<input checked="" type="checkbox"/>	Trisomy 16
<input checked="" type="checkbox"/>	Trisomy 22
Sex Chromosome Aneuploidies	
<input checked="" type="checkbox"/>	Monosomy X (Turner syndrome)
<input checked="" type="checkbox"/>	XXY (Klinefelter syndrome)
<input checked="" type="checkbox"/>	XXX
<input checked="" type="checkbox"/>	XYY
Deletion Syndromes	
<input checked="" type="checkbox"/>	5p (CriOdu Chat syndrome)
<input checked="" type="checkbox"/>	1p36
<input checked="" type="checkbox"/>	2p33.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Prader-Will/ Angelman Syndrome (15q11.2)
<input checked="" type="checkbox"/>	Jacobsen Syndrome (11q23)
<input checked="" type="checkbox"/>	DiGeorge Syndrome II (10p14-p13)
<input checked="" type="checkbox"/>	16p12
<input checked="" type="checkbox"/>	Van der Woude Syndrome (1q32.2)

Test Information	
✓	Twin Pregnancy (trisomies only)
✓	IVF Pregnancy
✓	Egg Donor Pregnancy
Tested Samples: 1,000,000	
Turnaround time 10 working days	
Available from week 10 of pregnancy	

آنوپلوئیدی‌های کروموزوم جنسی

آنوپلوئیدهای کروموزوم جنسی شامل اختلالات عددی در کروموزوم X و Y به صورت حذف یا اضافه شدن هستند. اگرچه علائم بالینی مبتلایان عموماً خفیف بوده و بدون ناتوانایی‌های ذهنی است، اما بعضی‌ها دچار مشکلات فنوتیپی مثل اختلالات فیزیکی، تأخیر در یادگیری و ناباروری هستند.

در این تست علاوه بر جنسیت جنین، آنوپلوئیدی‌های کروموزوم‌های جنسی مانند سندرم ترنر نیز از هفته دهم قابل تشخیص است.



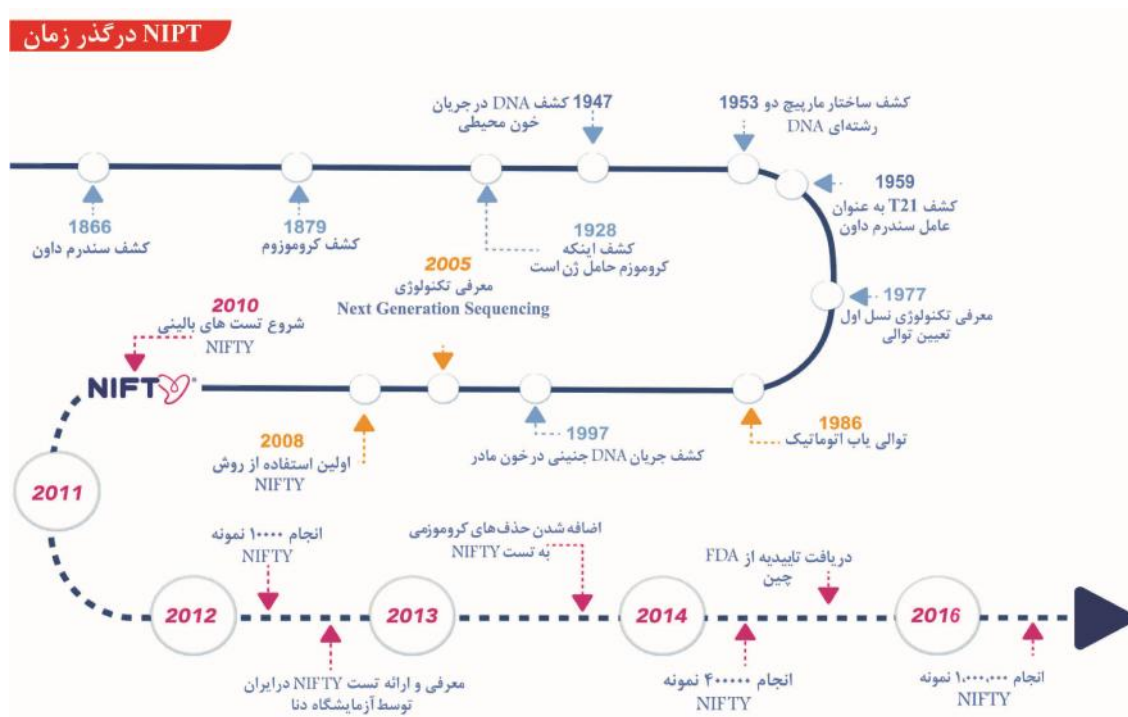
در طی دو دهه اخیر روش‌های مختلفی شامل اندازه‌گیری مارکرهای شیمیایی و پارامترهای سونوگرافی و همچنین ترکیب این دو باهم، برای غربالگری سندرم داون ابداع شده است، اما به علت اشکالات موجود در این روش‌ها، دانشمندان همیشه به دنبال یافتن روش‌هایی بهتر بودند.

بزرگ‌ترین ایراد در روش‌های سنتی غربالگری، درصد بالای نتایج مثبت و منفی کاذب و در تست‌های تأییدی احتمال سقط جنین به علت تهاجمی بودن روش نمونه‌گیری است. در روش NIPT بدون نیاز به سلول‌های بافت جفت⁽³⁾ (CVS) یا نمونه‌گیری از مایع آمنیوتیک (آمنیوسنتز)، از چند میلی‌لیتر خون وریدی مادر استفاده شده و درصد موارد مثبت و منفی کاذب نیز به میزان کمتر از 1 درصد کاهش می‌یابد.

بزرگ‌ترین ابراد روش‌های سنتی غربالگری، درصد بالای نتایج مثبت و منفی کاذب است.

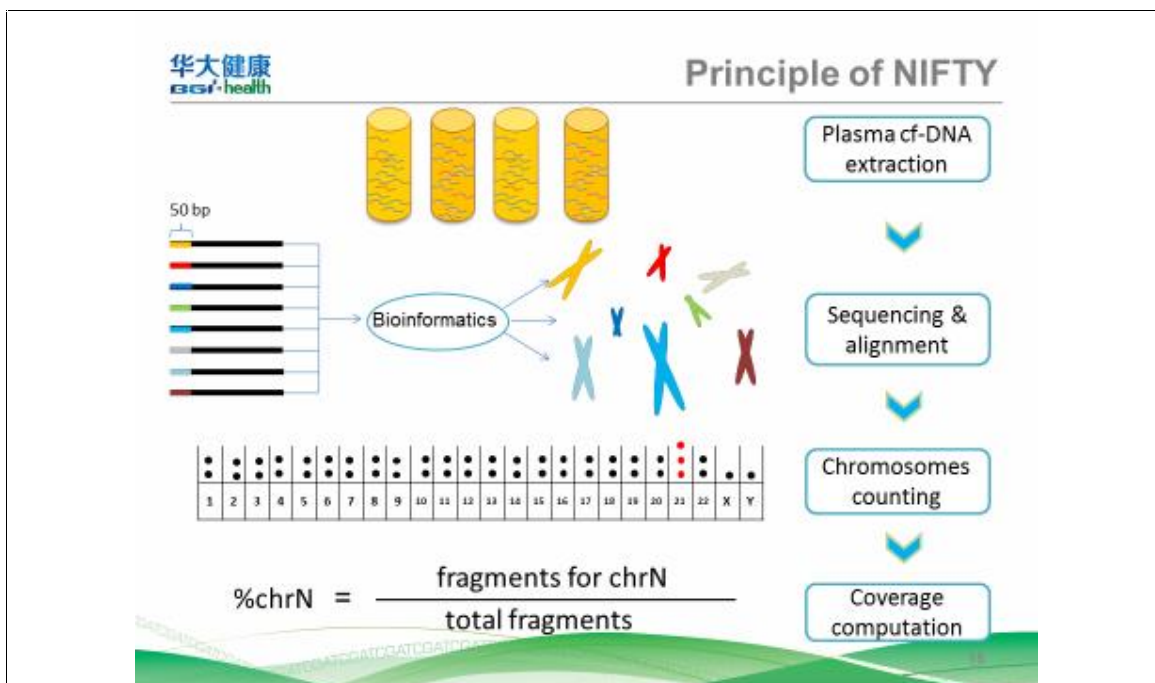
در سال 1997 دانشمندان به وجود DNA جنین در خون مادر پی بردند. این کشف مهم که با ردیابی قسمت‌هایی از کروموزوم Y جنینی در سرم مادر توسط Dennis Lo صورت گرفت، اساسی شد برای ظهور روش‌های غیرتهاجمی تشخیص آنوپلوئیدی‌ها در دوران بارداری. اصول این روش بر پایه اندازه‌گیری DNA آزاد در پلاسما است که از سلول‌های مرده جفت آزاد می‌شوند. صاحب نظران این کشف را یک انقلاب در علوم تشخیصی می‌دانند و پیش‌بینی می‌کنند که در آینده نزدیک جایگزین تست‌های رایج غربالگری و تشخیص دوران بارداری گردد.

بالاخره موفقیت واقعی در سال 2008 حاصل شد؛ زمانی که دو گروه مستقل از محققین با مطالعه بر روی دو جمعیت 18 و 14 تایی از جنین‌های مبتلا به آنوپلوئیدی، قدرت تشخیص تریزومی‌های جنینی را با استفاده از تکنیک Massively Parallel Sequencing با درستی بیشتر از 99 درصد به اثبات رساندند.



تکنیک آزمایش به این صورت است که ابتدا 50 جفت⁽²⁾ (BP) از فراگمنت‌های DNA جنین در خون مادر تعیین توالی شده، سپس با استفاده از محاسبات و نقشه‌برداری‌های بیوانفورماتیک تعداد کروموزوم‌های جنین محاسبه می‌شود.

NIPT میلیون‌ها قطعات DNA مادری و جنینی را در هر نمونه تعیین توالی می‌کند. با استفاده از تکنولوژی Next Generation Sequencing کل ژنوم و چهار آنالیز متفاوت بیوانفورماتیک اختصاصی، اطلاعات در طول کل ژنوم آنالیز شده و با مراجع استاندارد مقایسه می‌شود تا اختلافات ژنتیکی مشخص شود.



نیمه عمر این DNA بسیار کوتاه بوده و کمتر از 2 ساعت می باشد و بلافاصله بعد از تولد از خون مادر محو می گردد، بنابراین بارداری های قبلی اختلالی در نتیجه تست ندارد. برای جلوگیری از کاهش میزان DNA خون مادر، نمونه در لوله های حاوی ماده مخصوصی گرفته می شود که مقدار DNA را ثابت نگه می دارد.

مطالعات پرجمعیت تری اخیراً گزارش شده است که میزان تشخیص (Detection rate) این روش را برای تریزومی 21 به میزان 99/1 درصد و با ویژگی 99/7 تا 99/9 درصد نشان می دهد.

Overall Sample Total with Known Pregnancy Outcomes 112,669					
Trisomy	TP	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
T21	720	99.17%	99.95%	92.19%	99.99%
T18	167	98.24%	99.95%	76.61%	100%
T13	22	100%	96.96%	32.84%	100%
TOTAL	909	99.02%	99.86%	85.27%	99.99%

Samples were collected between Jan 2011 and Aug 2013. Study was published in the Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology.

به منظور آشنایی بیشتر با ارقام مورد بحث اگر فرض کنیم که کل موارد بارداری در ایران سالانه یک میلیون و سیصد هزار نفر باشد در صورت انجام غربالگری با روش جدید NIPT، منافع ذیل قابل دستیابی است:

1- در روش رایج تعداد بیمارانی که با نتیجه مثبت کاذب جهت انجام آزمایش تأییدی آمینوسنتز معرفی می شوند تقریباً 65000 بیمار است اما با روش NIFTY تنها 442 نفر خواهند بود؛ بدین معنی که سالانه بیش از 64500 مورد انجام روش

آمیونستز کمتر درخواست می‌شود.

2- تعداد موارد سقط جنین به دلیل ارجاع جهت نمونه‌گیری تهاجمی در روش اول تقریباً 650 و در روش جدید فقط 6 مورد می‌باشد.

3- موارد منفی کاذب در روش غربالگری سنتی تقریباً 325 مورد است، اما در روش جدید 1 یا 2 مورد خواهد بود یعنی 323 بیمار کمتر در یک سال.

باید توجه داشت که انجام این تست نیاز به آزمایش (AFP)⁽⁶⁾ را برای بررسی NTDs در سه ماهه دوم از بین نبرده و خانم باردار باید حتماً در هفته‌های 15 تا 20 بارداری مجدداً به آزمایشگاه مراجعه کند.

باید توجه داشت که هنوز در مورد کسانی که نتیجه تست cell free DNA آن‌ها مثبت (پرخطر) می‌شود باید تست تأییدی مانند CVS یا آمیونستز انجام شود، ولی با توجه به درصد مثبت کاذب بسیار پایین، تعداد مواردی که نیاز به این کار می‌باشد بسیار اندک خواهد بود.

مقایسه روش‌های غربالگری سندرم داون				
ماهیت روش	سن بارداری	مثبت کاذب	قدرت تشخیص	روش
غیر تهاجمی	۱۱-۱۳ ^{۰۶} ۱۵-۲۰ ^{۰۶}	%۵	%۷۰ - %۹۰	غربالگری با استفاده از مارکرهای شیمیایی خون مادر
غیر تهاجمی	۱۱-۱۳ ^{۰۶}	%۵	%۶۰ - %۸۰	سونوگرافی NT
تهاجمی (خطر سقط ۱ تا ۲ درصد)	۱۰-۱۳	صفر	>%۹۹	CVS
تهاجمی (خطر سقط ۰.۵ تا ۱ درصد)	۱۶-۲۱	صفر	>%۹۹	آمیونستز
غیر تهاجمی	از هفته ۱۰	%۰/۱	>%۹۹/۹	NIPT

مزایای تست:

غیرتهاجمی بودن، برای انجام آزمایش فقط به چند میلی‌لیتر از خون مادر احتیاج است. حساسیت و صحت بالا، مطالعات بر روی جمعیت‌های بزرگ ویژگی و حساسیت بیشتر از 99 درصد را نشان داده است. تشخیص زود هنگام، آزمایش از هفته دهم بارداری قابل انجام بوده و این زمان به تصمیم‌گیری بهتر کمک می‌کند. اگرچه تا سال 2013 اکثر تحقیقات بر روی مفید بودن این تست در مورد بارداری‌های پرخطر انجام گرفته ولی در سال 2014 دو مرکز بسیار معتبر یعنی کالج ژنتیک پزشکی آمریکا⁽⁴⁾ (ACMG) و کالج سلطنتی بیماری‌های زنان و زایمان⁽⁵⁾ (RCOG) و همچنین پروفیسور Kypros Nicolaides کاربرد NIPT را به‌عنوان یک تست غربالگری با حساسیت بالا پیشنهاد کرده‌اند.

تابه حال بیش از 800000 مورد تست NIFTY انجام شده است که بالاترین تعداد در بین تست‌های NIPT در دنیا است

موارد کاربرد:

* به‌عنوان یک تست مرحله دوم، در مورد کسانی که دارای بارداری پرخطر محسوب می‌شوند.

1- خانم‌های بارداری که نتیجه تست غربالگری آن‌ها مثبت شده است.

2- زنان با سن بیشتر از 35 سال

3- زنان بارداری که در بررسی‌های سونوگرافی پرخطر تشخیص داده شده‌اند.

4- کسانی که سابقه قبلی حاملگی با اختلالات کروموزومی دارند.

5- فردی که از طریق IVF باردار شده و یا قبلاً سقط‌جنین تکراری داشته است.

6- مواردی که منع استفاده از تست‌های تهاجمی دارند، مثل Placenta Parvia، کسانی که خطر سقط‌جنین در آن‌ها بالا است و افراد مبتلا به عفونت هیپاتیت B.

* به‌عنوان یک تست غربالگری با قدرت تشخیص بسیار بالا، برای کسانی که نمی‌خواهند میزان ریسک منفی کاذب، در روش‌های رایج غربالگری را بپذیرند.

* یک انتخاب به‌عنوان یک تست تأییدی برای زنانی که قادر به پذیرش خطر روش‌های تهاجمی نیستند و یا از نحوه نمونه‌گیری در روش‌های تهاجمی وحشت دارند.

* یک انتخاب برای مواردی که کشت سلولی با شکست مواجه می‌شود.

پیشنهادها:

1- خانم‌های باردار باید قبل از تصمیم‌گیری در مورد انتخاب روش مورد استفاده برای غربالگری و یا تأیید نتیجه مثبت (پرخطر) در روش‌های رایج غربالگری، مورد مشاوره قرار گرفته و از مزایا و معایب همه روش‌های موجود مطلع گردند.

2- کاربرد این تست برای کسانی که از نحوه نمونه‌گیری روش‌های تهاجمی وحشت دارند.

3- انجام تست NIPT برای زنانی که نمی‌توانند خطر سقط در روش‌های تهاجمی را بپذیرند، مانند زنانی که پس از درمان‌های طولانی و پرهزینه و یا در سنین بالا باردار شده‌اند.

منابع:

1-Glenn E. Palomaki, CosminDeciu, Edward M. Kloza, GERALYN M. Lambert-Messerlian, DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as down syndrome: an international collaborative study, Genetics in medicine, Volume 14, Number 3, March 2012

2-Peter Benn, AntoniBorrell, Howard Cuckle, Lorraine Dugoff, Susan Gross, Prenatal Detection of Down Syndrome using Massively Parallel Sequencing (MPS): Prenatal Diagnosis, 24 October 2011

3-Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R, Lu V, et al. Noninvasive detection of fetal Trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet.Gynecol* 2011;204:205.e1–205.11.

4-Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, Leung TY, Sun H, Chan KC, Lun FM, et al. Non-invasive prenatal assessment of Trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ* 2011;342:c7401.

5-Ashoor, G., Syngelaki, A., Wagner, M., Birdir, C., Nicolaides, K.H., Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18, *Am J Obstet Gynecol.* (2012), doi: 10.1016/j.ajog.2012.01.029.

6-Chiu RWK, Akolekar R, Zheng YWL, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *Brit Med J.* 2011;342:c7401

7-Sparks, A.B., Struble, C.A., Wang, E.T., Song, K., Oliphant, A., Non-invasive Prenatal Detection and Selective Analysis of Cell-free DNA Obtained from Maternal Blood: Evaluation for Trisomy 21 and Trisomy 18, *Am J Obstet Gynecol.* (2012), doi: 10.1016/j.ajog.2012.01.030.

8-RossaWK Chiu, RanjitAkolekar, YamaWLZheng, Tak Y Leung, Hao Sun..., Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study, *BMJ* 2011;342:c7401

9-TzeKinLau,Fang Chen, Xiaoyu Pan, Ritsuko K . Pooh, Fuman Jiang, YihanLi, Hui Jiang, Xuchao, Li,Shengpei Chen &Xiuqing Zhang, Noninvasive prenatal diagnosis of common fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma DNA sequencing, *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine.* 2012

10-Shan Dan.,Fang Chen.,KwongWaichoy.,Fuman Jiang, Jingrong Lin, ZhaolingXuan, Wei Wang, Shengpei Chen, Xuchao Li ..., Prenatal Detection of Aneuploidy and Imbalanced Chromosomal Arrangements by Massively Parallel Sequencing, *PLoS ONE*, February 2012, Volume 7, Issue 2

11-Non Invasive Prenatal Testing for chromosomal abnormality using maternal plasma DNA. *Scientific Impact Paper No. 15*, March 2014

12-ACMG statement on noninvasive prenatal screeningfor fetal aneuploidy.Anthony R. Gregg, S.J. Gross, R.G. Best, K.G. Monaghan, K. Bajaj, B.G. Skotko,*Genet Med* advance online publication 4 April 2013

پانوشت

1. Neural Tube Defects
2. Basic Pair
3. Chorionic Villus Sampling
4. American College of Medical Genetics and Genomics
5. Royal College of Obstetrics & Gynecology
6. Alpha Feto Protein
7. American Collage of meical Genetic and Genomics

8. Royal Collage of Obstetrics & Gynecology

دکتر محمدرضا حکمت

دکتر مسعود گرشاسبی

دکتر میترا رفیع زاده

دکتر نوشین ندایی