

تست غیرتهاجمی تشخیص سندرم داون و تریزومی‌های 18 و 13

Non Invasive Fetal Trisomy (NIFTY)

دکتر محمدرضا حکمت - آزمایشگاه نیلوفر



در سال 1997 دانشمندان به وجود DNA جنین در خون مادر پی بردند. این کشف مهم که با ردیابی قسمت‌هایی از کروموزم 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 جفت آزاد می‌شوند. صاحب نظران، این کشف را یک انقلاب نامیدند و

پیش‌بینی می‌کنند که در آینده نزدیک تست‌های مبتنی بر آن، جایگزین روش‌های سنتی غربالگری و آزمایش‌های تشخیصی دوران بارداری گردد.

بر اساس اندازه‌گیری cell free DNA به طور کلی تمرکز برنامه‌های 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 شایع‌ترین آنوپلوئیدی در انسان با شیوع تقریباً 1 در 800 است. ریسک ابتلا جنین به سندرم داون با افزایش سن زیاد می‌شود، بطوریکه یک خانم 45 ساله دارای ریسک 1 به 35 است. افراد مبتلا به سندرم داون توان ذهنی پایین‌تر از حد میانگین دارند و به طور معمول دچار ناتوانی ذهنی خفیف تا متوسط هستند. تعداد کمی از مبتلایان به سندرم داون دچار ناتوانی شدید ذهنی می‌باشند.

افراد مبتلا ممکن است دچار این مشکلات شوند: ناراحتی‌های قلبی مادرزادی، ابتلا سریع به بیماری‌های عفونی، مشکلات تنفسی و برخی ناراحتی‌های گوارشی. باید توجه داشت که پیشرفت‌های علم پزشکی درمان اکثر آنها را امکان پذیر ساخته است، به گونه‌ای که افراد با سندرم داون تا سنین بالا (حدود 55 سالگی) می‌توانند زندگی کنند. بر اساس آمار ثبت شده در امریکا انتظار می‌رود که به ازای هر یک میلیون بارداری حدود 1800 مورد سندرم داون، 300 مورد تریزومی 18 و 140 مورد تریزومی 13 بروز کند.

تریزومی‌های 18 و 13 نیز مانند سندرم داون در سه ماهه اول و دوم شایع‌تر از موقع زایمان بوده و به میزان زیادی سقط خودبخودی در آنها اتفاق می‌افتد. مبتلایان به تریزومی 18 و 13 دارای عمر کوتاهی بوده و فقط 5 تا 10 درصد آنها تا یک سالگی زنده می‌مانند. در طی دو دهه اخیر روش‌های مختلفی شامل اندازه‌گیری مارکرهای شیمیایی و پارامترهای سونوگرافی و همچنین ترکیب این دو با هم 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 تست تأییدی احتمال سقط جنین به علت تهاجمی بودن روش نمونه‌گیری است. از دیگر نکات منفی روش‌های غربالگری رایج میتوان به چند مرحله‌ای بودن پروسه آزمایش، نتایج غیر اختصاصی و گاهی گیج‌کننده و غیر قابل تصمیم‌گیری و در نتیجه افزایش ریسک استفاده از روش‌های تهاجمی اشاره کرد. در سال 1997 دانشمندان به وجود DNA جنین در خون مادر پی بردند. این کشف مهم که با ردیابی قسمتهایی از کروموزم 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 تست های رایج غربالگری و تشخیصی دوران بارداری گردد.

بالاخره موفقیت واقعی در سال 2008 حاصل شد، زمانیکه دو گروه مستقل از محققین با مطالعه بر روی دو جمعیت 18 و 14 تایی از جنین‌های مبتلا به آنوپلوئیدی، قدرت تشخیص تریزومی‌های جنین را با استفاده از تکنیک Massively Parallel Sequencing با درستی 100 درصد به اثبات رساندند. مطالعات پرجمعیت‌تری اخیراً گزارش شده است که میزان تشخیص (Detection rate) این روش را برای تریزومی 21 به میزان 99/9٪ و با ویژگی 97/9 تا 99/7 درصد نشان می‌دهد. (2) NIFTY روش جدید و غیر تهاجمی غربالگری و با استفاده از تکنولوژی تعیین توالی (3)، DNA آزاد جنین در خون مادر را که از هفته دوازدهم بارداری به میزان کافی افزایش می‌یابد، بررسی می‌کند. نیمه عمر این DNA بسیار کوتاه بوده و کمتر از 2 ساعت می‌باشد و بلافاصله بعد از تولد از خون مادر محو می‌گردد بنابراین بارداری‌های قبلی اختلالی در نتیجه تست ندارد. در این روش بدون نیاز به سلولهای بافت جفت (4) (CVS) یا نمونه‌گیری از مایع آمنیوتیک (آمنیوسنتز)، از چند میلی‌لیتر خون وریدی مادر استفاده می‌شود. در این روش علاوه بر اینکه در یک تست همزمان تریزومی‌های 21، 18 و 13 به ترتیب با حساسیت 99/9 درصد بررسی می‌شوند، درصد موارد مثبت و منفی کاذب نیز به میزان کمتر از 1/ درصد کاهش می‌یابد. باید توجه داشت که انجام این تست، نیاز به آزمایش AFP(5) 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.

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

- 1- در روش سنتی تعداد بیمارانی که با نتیجه مثبت کاذب جهت انجام آزمایش تأییدی آمنیوسنتز معرفی می‌شوند تقریباً 50000 بیمار است اما با روش NIFTY تنها 340 نفر خواهند بود. بدین معنی که سالانه بیش از 49600 مورد انجام روش آمنیوسنتز کمتر درخواست می‌شود.
- 2- تعداد موارد سقط جنین به دلیل ارجاع جهت نمونه‌گیری تهاجمی در روش اول تقریباً 400 و در روش جدید فقط 3 مورد می‌باشد.
- 3- موارد منفی کاذب در روش غربالگری سنتی تقریباً 200 مورد است، اما در روش جدید کمتر از 1 مورد خواهد بود یعنی 199 بیمار کمتر در یکسال.

مقایسه روشهای غربالگری سندرم داون				
روش	قدرت تشخیص	مثبت کاذب	سن بارداری	ماهیت روش
غربالگری با استفاده از مارکرهای شیمیایی خون مادر	70%-90%	5%	11-13 ⁺⁶ 15-20 ⁺⁶	غیرتهاجمی
سونوگرافی NT	60%-80%	5%	11-13 ⁺⁶	غیرتهاجمی
CVS	>99%	0	10-13	تهاجمی (خطر سقط ۱ تا ۲ در صد)
آمניوسنتز	>99%	0	16-21	تهاجمی (خطر سقط ۰/۵ تا ۱ در صد)
cell free DNA	>99%	0.034%	12-24	غیرتهاجمی

مزایای تست:

- غیرتهاجمی بودن، برای انجام آزمایش فقط به 10 میلی لیتر از خون مادر احتیاج است.
- حساسیت و صحت بالای تست، مطالعات بر روی جمعیت های بیشتر از 1000 نفر ویژگی و حساسیت 99/9٪ را نشان داده است.
- تشخیص زودهنگام، آزمایش از هفته 12 بارداری قابل انجام بوده و این زمان به تصمیم گیری بهتر کمک می کند.

موارد کاربرد:

- به عنوان یک تست غربالگری با قدرت تشخیص بسیار بالا
- به عنوان یک تست تأییدی در مورد کسانی که دارای نتیجه پرخطر در روشهای غربالگری رایج هستند.
- یک انتخاب به عنوان تست تأییدی برای زنانی که قادر به پذیرش خطر روش های تهاجمی نیستند و یا از نحوه نمونه گیری در روش های تهاجمی وحشت دارند.
- یک انتخاب برای مواردی که کشت سلولی با شکست مواجه می شود.

صاحب نظران کشف وجود DNA جنین در خون مادر را یک انقلاب در علوم تشخیصی می دانند و امیدوارند که در آینده نزدیک روشهای مبتنی بر اندازه گیری این DNA جایگزین تست های رایج غربالگری گردد.

در روش تهاجمی علاوه بر احتمال سقط جنین (0/4 تا 2 درصد)، فشار روحی قابل توجه به مادر، دردناک بودن روش نمونه‌گیری و ریسک عفونت‌های داخل رحمی نیز قابل ذکر می‌باشند. اصولاً انتخاب بین تست‌های سنتی غربالگری که در آن احتمال خطا بالاست و آمنیوسنتز یا CVS که احتمال سقط جنین را به همراه دارند برای زنان باردار کار دشواری است. همچنین از نظر زمانی نیز انجام روش‌های غربالگری که در سه ماهه دوم بارداری امکان پذیر می‌باشد محدودیت‌های زمانی را نیز برای تصمیم‌گیری در مورد سقط قانونی یا نگهداشتن جنین به همراه دارد. علاوه بر آن در بسیاری از موارد در صورت مثبت یا مشکوک بودن تست غربالگری در 3 ماهه اول، بیمار مجبور به انجام تست تاییدی در 3 ماهه دوم خواهد بود و در طول این مدت تا انجام و دریافت نتیجه آزمایش دچار استرس و نگرانی می‌شود.

پیشنهادات:

- 1- انجام روش مولکولی جدید (NIFTY) برای غربالگری آنوپلوئیدی‌ها.
- 2- کاربرد این تست برای کسانی که از نحوه نمونه‌گیری روش‌های تهاجمی وحشت دارند.
- 3- انجام تست برای زنانی که نمی‌توانند خطر سقط در روش‌های تهاجمی را بپذیرند.
- 4- انجام آمنیوسنتز در مورد جوابهای مثبت در NIFTY.
- 5- انجام آزمایش AFP در سه ماهه دوم برای بررسی NTDs.

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. Tze KinLau, 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., Kwong Waichoy., Fuman Jiang, Jingrong Lin, Zhaoling Xuan, 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