



TRISOMY*test*



TRISOMY*test XY*



TRISOMY*test+*

# ZDRAVIE PLODU NIE JE HÁDANKA

Spolehlivý neinvazívny test na vylúčenie Downovho syndrómu  
a ďalších aberácií plodu z krvi tehotnej ženy

PRÍRUČKA PRE ODBORNÍKOV

*TRISOMY test*

# **ZÁKLADNÉ INFORMÁCIE**

# Čo je TRISOMY test a jeho varianty TRISOMY test XY a TRISOMY test +

NEINVAZÍVNE PRENATÁLNE SKRÍNINGOVÉ VYŠETRENIE Z KRVI  
TEHOTNEJ NA VYLÚČENIE VYBRANÝCH CHROMOZÓMOVÝCH  
PORÚCH A URČENIE POHLAVIA PLODU.

---

**TRISOMY test** je neinvazívne prenatálne skrínigové vyšetrenie plodu na určenie rizika úplnej trizómie niektorého z chromozómov 21, 18 alebo 13, ktoré sú príčinou Downovho, Edwardsovho alebo Patauovho syndrómu. Výsledok vyšetrenia môže obsahovať aj informáciu o pravdepodobnom pohlaví plodu, ktorá sa poskytuje len na žiadosť tehotnej.

**TRISOMY test XY** rovnako zisťuje riziko úplnej trizómie chromozómov 21, 18 a 13, ale stanovuje aj chromozómové pohlavie plodu a prípadnú patológiu počtu pohlavných chromozómov.

**TRISOMY test +** zisťuje riziko úplnej trizómie chromozómov 21, 18 a 13, chromozómové pohlavie plodu a poruchy počtu pohlavných chromozómov. Ďalej zisťuje riziko vybraných mikrodencií chromozómov, pri ktorých chýba časť niektorého chromozómu.

Bežne používané označenie tejto metódy ako **NIPT – Non Invasive Prenatal Testing** (neinvazívne prenatálne genetické laboratórne vyšetrenie) – sa vzťahuje na spôsob získania vzorky. Vyšetrenie sa vykonáva zo vzorky krvi tehotnej už od 11. týždňa tehotenstva, neinvazívne, bez rizika pre plod. Výsledkom NIPT testov je informácia o vybraných genetických poruchách chromozómov, ktoré sa v populácii vyskytujú štatisticky najčastejšie. Trizómie chromozómov 21, 18 a 13 tvoria až 75 % chromozómových aberácií plodu a spolu s poruchami počtu pohlavných chromozómov je to až 83 % chromozómových aberácií, ktoré sa dajú zachytiť konvenčnými cytogenetickými metódami.\* Testy NIPT nezisťujú všetky genetické či iné vývinové poruchy, ktoré sa môžu vyskytnúť.

---

\* Norton ME a kol. Chromosome abnormalities detected by current prenatal screening and noninvasive prenatal testing. *Obstet Gynecol.* 2014 Nov;124(5):979-86.

## POROVNANIE TESTOV



Chromozómové poruchy

Trizómie

Stanovenie pohlavia

Poruchy pohlavných chromozómov

Mikrodelécie



Cena vyšetrenia



Stanovenie výsledkov\*



Vyšetrenie indikuje



TRISOMY test



TRISOMY test XY



TRISOMY test +

TRISOMY test	TRISOMY test XY	TRISOMY test +
Downov syndróm (trizómia 21) Edwardsov syndróm (trizómia 18) Patauov syndróm (trizómia 13)	Downov syndróm (trizómia 21) Edwardsov syndróm (trizómia 18) Patauov syndróm (trizómia 13)	Downov syndróm (trizómia 21) Edwardsov syndróm (trizómia 18) Patauov syndróm (trizómia 13)
Pravdepodobné pohlavie plodu	Chromozómové pohlavie plodu	Chromozómové pohlavie plodu
	Turnerov syndróm (45, X) Klinefelterov syndróm (47, XXY) XYY syndróm (47, XYY) XXX syndróm (47, XXX)	Turnerov syndróm (45, X) Klinefelterov syndróm (47, XXY) XYY syndróm (47, XYY) XXX syndróm (47, XXX)
		DiGeorgeov syndróm (22q11) Praderov-Williho a Angelmanov syndróm (15q11) Cri-du-chat syndróm (5p15) Syndróm delécie 1p36 Wolfov-Hirschhornov syndróm (4p16.3)
350 €	390 €	450 €
5 pracovných dní	5 pracovných dní	5 pracovných dní
gynekológ alebo lekársky genetik	gynekológ alebo lekársky genetik	gynekológ alebo lekársky genetik

Test nezisťuje všetky genetické či iné vývojové poruchy, ktoré sa môžu vyskytnúť.

\* Vyšetrenia TRISOMY test, TRISOMY test XY a TRISOMY test + zabezpečujú laboratória Medirex v Bratislave, vďaka čomu sú výsledky testovania známe spravidla do 5 pracovných dní. V prípade, že dodaný vzorku nebolo možné laboratórne spracovať v súlade so správnou laboratórnou praxou alebo výsledok vyšetrenia neodpovedá na diagnostickú otázku, laboratórium bezodplatne zopakuje vyšetrenie z tej istej vzorky. V takomto prípade sa dodanie výsledku predĺži z 5 na 8 pracovných dní (týka sa to asi 10 % vzoriek).

Ak sa ani z opakovanej analýzy nepodarí stanoviť informatívny záver vyšetrenia, alebo v krvi nebol dostatočný podiel DNA plodu (menej ako 4 % prípadov), odber krvi je potrebné opakovať spravidla o 14 kalendárnych dní od prvého odberu. Podiel DNA plodu v krvi tehotnej ženy, ktorý je nevyhnutný na jednoznačné stanovenie záveru laboratórnej analýzy, sa počas tehotenstva zvyšuje. Preto v 3/4 opakovaných analýz z nových odberov krvi v laboratóriu dospejeme k informatívnemu záveru vyšetrenia, čo znamená, že po absolvovaní TRISOMY testu a jeho variantov je neinformatívnych výsledkov menej ako 1%.

# Pre koho je test určený?

TRISOMY TEST A JEHO ALTERNATÍVY MÔŽE PODSTÚPIŤ NA VLASTNÚ ŽIADOSŤ KAŽDÁ TEHOTNÁ ŽENA, KTORÁ CHCE ZISTIŤ, ČI JEJ PLOD NIE JE POSTIHNUTÝ NIEKTOROU Z VYŠETROVANÝCH TRIZÓMIÍ 21, 18 A 13, ABERÁCIÍ POČTU POHLAVNÝCH CHROMOZÓMOV A VYBRANÝCH CHROMOZÓMOVÝCH MIKRODELÉCIÍ.

---

**Konzultáciu pred TRISOMY testom a jeho alternatívami poskytne tehotnej poučený zmluvný gynekológ alebo lekársky genetik.**

**Absolvovanie TRISOMY testu a jeho alternatív je limitované indikáciou a/alebo kontraindikáciou. Tehotná si test môže kúpiť podľa vlastného uváženia, ale nemôže si ho „nárokovat“, napr. v prípade, ak odborník povie, že to nie je vhodná metóda vo vzťahu k jej konkrétnemu prípadu. Čím je podrobnejšie vyšetrenie, tým je interpretácia výsledku náročnejšia.**

Je zvlášť vhodný pre tehotné ženy, ktoré:

- majú **zvýšené obavy** z možného postihnutia plodu niektorou z vyšetrovaných trizómií,
- budú mať v čase pôrodu **viac ako 35 rokov** a mali negatívny výsledok biochemického skríningu alebo ultrazvuku,
- absolvovali skríninng nižšej výpovednej sily (napr. triple test), alebo mali hraničný výsledok,
- otehotneli **po umelom oplodnení**,

- mali **pozitívny výsledok biochemického skríningu** a je potrebné potvrdiť ho ďalším vyšetrením (amniocentézou),\*
- absolvovali **ultrazvukové vyšetrenie** s výsledkom poukazujúcim na zvýšené riziko sledovaných chromozómových porúch,\*
- mali **v minulosti tehotenstvo s preukázanou chromozómovou poruchou**, ktorú vyšetruje TRISOMY test alebo jeho alternatívy,\*
- u niektorého z rodičov bola diagnostikovaná tzv. Robertsonova translokácia (zvýšené riziko trizómie 21 alebo 13 plodu),\*
- prekonalí opakované spontánne potraty,\*
- sa chcú **vyhnúť amniocentéze** alebo majú komplikácie, ktoré môžu zvyšovať jej riziko, ako napríklad: zvýšené riziko spontánneho potratu, znížená zrážanlivosť krvi, riziko imunizácie pri nesúlade krvných skupín (negatívny Rh-faktor), obdobie medzi 14. a 16. týždňom gravidity, myómy maternice, placenta praevia (vcestná placenta).
- majú zvýšené riziko možného postihnutia plodu niektorým zo syndrómov, ktoré vyšetruje TRISOMY test XY alebo TRISOMY test +, napríklad na základe výsledku ultrazvukového vyšetrenia.

---

\* Vyšetreniu musí predchádzať genetická konzultácia.

*TRISOMY test*

**PRIEBEH VYŠETRENIA**

# Od odberu po výsledok

PRIEBEH VYŠETRENÍ TRISOMY TEST, TRISOMY TEST XY AJ TRISOMY TEST + JE ROVNAKÝ. PROCES VYŠETRENIA, OD ODBERU KRVI PO ELEKTRONICKÉ ODOSLANIE VÝSLEDKU TESTU INDIKUJÚCEMU LEKÁROVI, TRVÁ SPRÁVIDLA 5 PRACOVNÝCH DNÍ.

## Rýchlosť procesu

je závislá od bezproblémového priebehu jednotlivých krokov:



odber krvi,



doručenie vzorky do laboratória,



úhrada za vyšetrenie,



laboratórna analýza a vyhodnotenie získaných dát,



doručenie výsledku lekárovi.



Tehotná je o stave vyšetrovanej vzorky priebežne informovaná SMS notifikáciami:

- po doručení vzorky do laboratória,
- pri identifikácii platby za vyšetrenie,
- po zaslaní výsledku ošetrujúcemu lekárovi, ktorý výsledok interpretuje.



## ODBER KRVI

---

Vzorku 10 ml periférnej krvi **odoberá** tehotnej **osoba ženského pohlavia** – zdravotná sestra. Minimalizuje sa tak možnosť kontaminácie vzorky mužskou DNA, ktorá by mohla ovplyvniť správne stanovenie pohlavia plodu (v prípade žiadosti o určenie pohlavia plodu). Odber sa nemusí robiť nalačno a možno ho uskutočniť už od 11. týždňa tehotenstva. Pred ukončeným 12. týždňom tehotenstva však laboratórium poskytuje len fyziologický výsledok bez uvedenia pohlavia plodu. Patologický výsledok vyšetrenia sa pred ukončeným 12. týždňom tehotenstva poskytuje len na základe genetickej indikácie.

TRISOMY test a jeho varianty sa najčastejšie vykonávajú medzi 11. a 22. týždňom tehotenstva. Voľba najskoršieho, resp. najneskoršieho možného termínu závisí od preferencie tehotnej a od odporúčania lekára.

**Vzorku krvi, odobranú do skúmavky s obsahom EDTA**, je potrebné označiť samolepiacim čiarovým kódom (súčasť žiadanky), menom a rodným číslom tehotnej. Odberovú skúmavku je potrebné po naplnení opatrne, no dôkladne premiešať (10x obrátiť hore dnom – nepretrepávať). Biologický materiál je potrebné uchovávať pri teplote 4 °C. Vzorka nesmie zmrznúť.

V prípade očakávaného predĺženia času transportu vzorky do laboratória na viac ako 36 hodín od odberu je potrebné použiť odberový systém Streck Cell Free DNA BCT. Pri použití týchto odberových skúmaviek nie je potrebné uchovávať vzorky pri 4 °C, ideálna je bežná laboratórna teplota, vzorka podobne ako pri použití štandardných EDTA obsahujúcich skúmaviek nesmie zmrznúť.



## DORUČENIE VZORKY DO LABORATÓRIA

---

Vzorku spolu s úplne a správne vyplnenou žiadankou, uloženú v samostatnom transportnom vrecúšku a termotaške (pri teplote 4 °C), je potrebné doručiť do Centrálného laboratória Medirex, a. s., v Bratislave najneskôr do 36 hodín od odberu.

Požiadavku na transport vzorky je potrebné najmenej 24 hodín pred plánovaným odberom vopred odsúhlasiť s dopravným dispečingom Medirex, a. s.: 0800 00 30 30, [dispecing@medirex.sk](mailto:dispecing@medirex.sk).



## ÚHRADA ZA VYŠETRENIE

---

### a) Priama platba v ambulancii

---

Ak zdravotnícke zariadenie vyžaduje platbu za laboratórne vyšetrenie na mieste, priamo v zdravotníckom zariadení, lekár je povinný príjem platby za laboratórne vyšetrenie potvrdiť v žiadanke na vyhradenom mieste a pacientke vydať potvrdenie. Laboratórium bude cenu za vyšetrenie fakturovať zdravotníckemu zariadeniu v najbližšom zúčtovacom období.





---

## b) Platba na účet laboratórií Medirex, a. s., prostredníctvom platobnej brány [www.medirexplatby.sk](http://www.medirexplatby.sk)

---

Ak nie je možné laboratórne vyšetrenie zaplatiť v ambulancii, cenu za vyšetrenie uhradí tehotná prostredníctvom platobnej brány [www.medirexplatby.sk](http://www.medirexplatby.sk) priamo na účet laboratórií Medirex, a. s., v ktorých sa vyšetrenie realizuje.

### Ako funguje platobná brána?

V online systéme zadá tehotná údaje potrebné na identifikáciu platby (podľa kópie žiadanky na vyšetrenie, ktorú jej po odbere krvi odovzdal lekár) a vyberie si spôsob platby.

### Bankovým prevodom z banky

Systém vygeneruje faktúru a platobný príkaz, ktoré obsahujú pridelený jedinečný variabilný symbol. Úhradu faktúry je potrebné čo najskôr realizovať v banke alebo pomocou e-bankingu.

### Platba pomocou platobnej brány 24-pay

Systém platiteľa presmeruje priamo na platobnú bránu 24-pay (okamžitá platba, platba kartou, platba prevodom), kde je možné platbu dokončiť. Platobná brána 24-pay je schválená a regulovaná Národnou bankou Slovenska. Číslo oprávnenia ODB-8835-5/2012.



## UVOLNENIE VZORKY NA ANALÝZU

---

S ohľadom na skoré dokončenie analýzy je platbu potrebné uskutočniť čo najskôr po odbere krvi. Vzhľadom na finančnú náročnosť vyšetrenia sa na analýzu zaradia len vzorky s identifikovanou úhradou. Laboratórium neručí za lehotu vyšetrenia vzorky s oneskorenou platbou, nesprávne uvedenými údajmi alebo sťaženou či znemožnenou identifikáciou platby. Vzorky bez identifikovanej platby nebudú vyšetrené!



## V LABORATÓRIU: ANALÝZA A VYHODNOTENIE DÁT

---

### 1. Spracovanie krvi

---

Po prijatí skúmavky s krvou do laboratória najskôr prebehne separácia plazmy, v ktorej sa nachádza genetický materiál plodu.

### 2. Izolácia DNA

---

Z plazmy sa viackrokovou precíznou purifikáciou získa voľná cirkulujúca DNA, ktorá pochádza aj od tehotnej, aj od plodu. DNA plodu predstavuje v priemere 14,5 %\* celkovej DNA získanej z plazmy. V prípade, že odber krvi nebol vykonaný v súlade s odporúčaniami, môže dôjsť k degradácii vzorky a k zníženiu podielu DNA plodu, čo znemožňuje detekciu prípadnej trizómie plodu. V laboratóriu po izolácii vykonávame kontrolu kvality vzorky, ktorou zisťujeme, či k rozpadu buniek skutočne nedošlo. Ak tento jav zistíme, informujeme ambulanciu o nutnosti opakovania odberu.

---

\* Hudecova I a kol. Maternal plasma fetal DNA fractions in pregnancies with low and high risks for fetal chromosomal aneuploidies. *PLoS One*. 2014 Feb 28;9(2):e88484.



---

### 3. Příprava vzorky DNA na analýzu

---

Izolovaná DNA sa v laboratóriu spracuje, pripraví sa sekvenačná knižnica. Sekvenačná knižnica je potrebná na analýzu použitím technológie celogenómového sekvenovania. V procese prípravy knižnice sa využíva aj amplifikácia DNA na namnoženie vzorky, pretože celkové množstvo DNA získanej z plazmy je veľmi malé. Príprava knižnice vhodnej na analýzu v prístroji trvá 48 hodín.

---

### 4. Kontrola kvality vzorky

---

TRISOMY test, TRISOMY test XY a TRISOMY test + sú časovo a finančne náročné vyšetrenia a ich výsledok závisí od správne pripravenej vzorky na analýzu. Či sa v laboratóriu podarilo pripraviť vhodnú sekvenačnú knižnicu, kontrolujeme citlivou fluorescenčnou elektroforetickou analýzou. Úspešne pripravené sekvenačné knižnice pokračujú do nasledujúcej fázy, ktorou je sekvenačná analýza.

---

### 5. Sekvenačná analýza

---

Čítaním miliónov fragmentov počas niekoľkohodinovej analýzy v genomickom sekvenačnom analyzátoe robíme celogenómovú analýzu s nízkym pokrytím (nečítame každú jednu bázu, ale štatisticky len každú desiatu). Výsledkom sekvenovania je získanie dát, ktoré sa vyhodnotia softvérom pomocou unikátneho matematického algoritmu. Počítačové vyhodnotenie dát, získaných z jednej vzorky, trvá na vysokovýkonnom serveri niekoľko minút.

---

### 6. Výsledok testovania

---

Na základe získaných údajov s použitím algoritmu so sofistikovaným štatisticko-matematickým modelom môžeme v laboratóriu stanoviť výsledok analýzy.



---

## DORUČENIE VÝSLEDKU LEKÁROVI

---

Výsledok vyšetrenia stanovíme spravidla do 5 pracovných dní odo dňa identifikovania platby na účte laboratórií. Výsledok zasielame do rúk lekára, ktorý vyšetrenie indikoval. Najskôr elektronicky, následne aj vo vytlačenej podobe.

**O výsledku vyšetrenia informuje tehotnú lekár, ktorý vyšetrenie indikoval.** Informáciu o pohlaví je možné tehotnej oznámiť až po ukončení 12. týždni tehotenstva, v súlade s uznesením č. 40/46 Etickej komisie MZ SR zo dňa 4. 2. 2013.\*

---

## Tehotná dostáva informáciu o stave vyšetrenia

---

Tehotná dostáva o priebehu vyšetrenia SMS notifikáciu (po odbere, úhrade za vyšetrenie a po stanovení výsledku pre jej ošetrojúceho lekára, ktorý výsledok interpretuje).

---

\* [www.health.gov.sk/Clanok?eticka-komisia-uznesenie-40-46](http://www.health.gov.sk/Clanok?eticka-komisia-uznesenie-40-46)

## Výsledky

VÝSLEDOK	INTERPRETÁCIA	ODPORÚČANIE
<b>Negatívny</b>	Nezistilo sa vysoké riziko ani jednej z vyšetrovaných chromozómových aberácií (v závislosti od verzie TRISOMY testu).	Výsledok s nízkym rizikom nie je potrebné overiť ďalším vyšetrením. O ďalšom priebehu zdravotnej starostlivosti rozhodne ošetrujúci lekár.
<b>Pozitívny</b>	Zistilo sa vysoké riziko minimálne jednej z vyšetrovaných chromozómových aberácií (v závislosti od verzie TRISOMY testu).	Výsledok s vysokým rizikom je potrebné potvrdiť genetickým vyšetrením vzorky získanej invazívnym spôsobom. Nevyhnutná je genetická konzultácia v ambulancii lekárskeho genetika.
<b>Neinformatívny výsledok</b>	Dodanú vzorku nebolo možné laboratórne spracovať v súlade so správnou laboratórnou praxou alebo výsledok vyšetrenia neodpovedá na diagnostickú otázku.	Odber krvi je potrebné opakovať (bez ďalšej úhrady za vyšetrenie) spravidla o 14 dní od prvého odberu.

# Skríningová forma vyšetrenia

---

Negatívny výsledok s nízkym rizikom testom detegovaných chromozómových aberácií sa vzťahuje výlučne na tieto aberácie. Nevylučuje možnosť postihnúť plodu inou genetickou poruchou a vo veľmi nízkom percente prípadov (falošne negatívne prípady) dokonca ani vyšetrovanou chromozómovou aberáciou. Test nie je zameraný na detekciu vývinových porúch (napr. defekty neurálnej trubice).

Výsledok testu môže skresliť viacplodové tehotenstvo (aj syndrómom miznúceho dvojčata) alebo cudzia DNA v krvi tehotnej, napríklad po krvnej transfúzii, transplantácii kmeňových buniek, transplantácii orgánov, pri nádorovom ochorení tehotnej alebo plodu. V týchto prípadoch je potrebné odber vopred individuálne konzultovať s laboratóriom.

Záchytnosť chromozómových aberácií môže byť tiež individuálne ovplyvnená mozaicizmom, predovšetkým fetoplacentárnym, alebo iným typom genetických, resp. epigenetických mechanizmov.

Ak sa tehotná lieči injekciami nízkomolekulového heparínu (Low Molecular Weight Heparin, LMWH), výsledok TRISOMY testu a jeho variantov môže byť s vyššou pravdepodobnosťou neinformatívny. V takých prípadoch sa odporúča vykonať odber krvi tesne pred plánovaným podaním ďalšej dávky LMWH.

Vysoká váha tehotnej (>90 kg) je asociovaná s vyšším zastúpením vzoriek s nízkou fetálnou frakciou, preto je v tejto skupine tehotných vyššie zastúpenie vzoriek s neinformatívnym výsledkom.

Pozitívny výsledok vyšetrenia s vysokým rizikom testom detegovaných chromozómových aberácií je potrebné napriek vysokej senzitivnosti a špecifickosti TRISOMY testu potvrdiť genetickým vyšetrením vzorky plodovej vody alebo choriových klkov. Pozitívny výsledok vyšetrenia s vysokým rizikom testom detegovaných chromozómových aberácií ani jedného z variantov TRISOMY testu nie je relevantný podklad ku žiadosti o umelé prerušenie tehotenstva zo zdravotných dôvodov.

Samostatnou kategóriou sú výsledky s doplnkovými zisteniami. V takýchto prípadoch laboratórny výsledok obsahuje informáciu o detekcii aj inej ako TRISOMY testom a jeho alternatívami vyšetrovanej chromozómovej aberácii.

---

## Upozornenie:

Vzhľadom na biologické a technické limitácie je presnosť vyšetrenia TRISOMY test +, zameraného na detekciu mikrodelečných syndrómov, v porovnaní s presnosťou vyšetrenia TRISOMY test, zameraného na detekciu trizómii chromozómov 21, 18, 13, nižšia. Pre nízky výskyt mikrodelečných syndrómov v populácii nie sú dostupné validačné štúdie, ktoré by spoľahlivo overili presnosť testu na ich neininvazívnu prenatalnú detekciu.

Pred rozhodnutím o využití TRISOMY testu pri poskytovaní zdravotnej starostlivosti dôkladne zvážte účel, výhody a prípadné riziká, ako i alternatívne možnosti TRISOMY testu, a uistite sa, že máte k dispozícii všetky potrebné informácie, týkajúce sa zdravotného stavu tehotnej, ktoré by mohli ovplyvniť výber najvhodnejšieho postupu pri poskytovaní zdravotnej starostlivosti.



Agilent Technologies

1-3  
4-6  
7-9  
10-12

**DNA Chip**  
On-Chip Electrophoresis  
LOT #: OM09BK10  
EXP: 09 DEC

*TRISOMY test*

**VEDECKÉ INFORMÁCIE**



# NIPT

## Neinvazívne prenatálne testovanie

### Vývoj NIPT

vo svete a na Slovensku:

- 
- 1997 objav voľnej cirkulujúcej DNA plodu

---

  - 1997 neinvazívne určenie pohlavia plodu prostredníctvom detekcie Y-chromozómových sekvencií

---

  - 1998 kvantitatívna analýza voľnej fetálnej DNA v maternálnej cirkulácii

---

  - 1998 neinvazívne určenie RhD statusu plodu

---

  - 1999 preukázané rýchle odbúranie voľnej fetálnej DNA po pôrode

---

  - 2000 neinvazívny DNA test na monogénne dedičné ochorenie (achondroplázia)

---

  - 2008 pilotné štúdie na neinvazívne stanovenie aneuploidie plodu

---

  - 2009 prvá aplikácia a potvrdenie konceptu, že sekvenovanie novej generácie (NGS) umožňuje detekciu trizómie 21 u plodu

---

  - 2010 detailne charakterizovaná rozdielnosť fragmentácie maternálnej a fetálnej DNA

---

  - 2010 neinvazívne stanovená podrobná genomická mapa plodu

---

  - 2011 dostupnosť komerčných testov NIPT

---

  - 2012 neinvazívne stanovená úplná genomická sekvencia plodu

---

  - 2015 zavedenie prvého, na Slovensku vyšetrovaného, neinvazívneho skríningu DNA plodu z krvi tehotnej do klinickej praxe – TRISOMY test

---

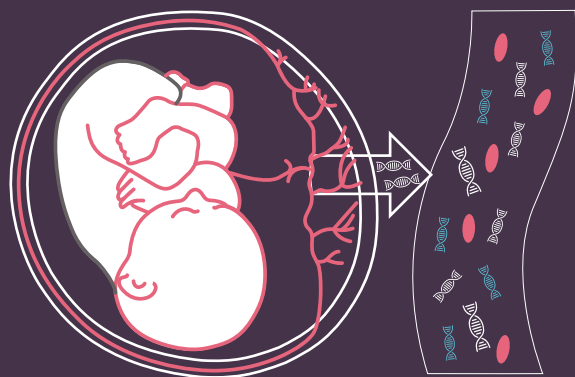
  - 2016 rozšírenie TRISOMY testu na varianty TRISOMY test XY a TRISOMY test + s možnosťou určenia rizika najčastejších trizómií, stanovenie pohlavia, aberácií počtu pohlavných chromozómov a vybraných chromozómových mikrodélcií plodu z krvi tehotnej
-

# Princíp TRISOMY testu

TRISOMY test využíva celogenómovú sekvenačnú analýzu voľnej fetálnej DNA izolovanej z periférnej krvi tehotnej. Dáta získané sekvenačnou analýzou s nízkym pokrytím sa vyhodnotia vlastným výpočtovým algoritmom a sú verifikované podľa postupu publikovaného Bianchi a kol. (2012).\*

Maternica

Krvný obeh tehotnej



DNA plodu

DNA tehotnej

# Klinický význam

Cieľom TRISOMY testu a jeho variantov je vylúčiť prípady častých chromozómových aberácií plodu s vysokou presnosťou už v raných štádiách tehotenstva a minimalizovať tak nutnosť absolvovať odber choriových klkov alebo amniocentézu,\* ktoré so sebou nesú určité riziko potratu vyvolaného invazívnym zákrokom.

Napriek veľmi vysokej senzitivnosti a špecifickosti záchytu sledovaných trizómii je **TRISOMY test a všetky jeho varianty skriningové vyšetrenie**, nie diagnostické.

V praxi to znamená, že **každý pozitívny výsledok vyšetrenia s vysokým rizikom detegovaných aberácií musí byť následne potvrdený zo vzorky získanej invazívnym odberom biologického materiálu plodu** (odber choriových klkov alebo plodovej vody) a **genetickým vyšetrením takto získanej vzorky** (pozri Interferencie).

Možný je však aj výskyt falošne negatívneho výsledku. TRISOMY test, rovnako ako iné NIPT, nevylučuje na 100 % prítomnosť aberácií (aj sledovaných) v prípade vydania negatívneho výsledku.

# Indikujúci lekár

TRISOMY test a jeho alternatívy indikuje lekár so špecializáciou gynekológia a pôrodníctvo alebo lekárska genetika, ktorý je spôsobilý interpretovať negatívny výsledok testu a v prípade patologického alebo nejasného výsledku vie zabezpečiť genetickú konzultáciu a nadstavbové genetické testovanie v potrebnom rozsahu.

Ak je primárnou indikáciou testovania NIPT konkrétna známa genetická patológia, genetická konzultácia sa pred testovaním odporúča obzvlášť dôrazne.

\* Bianchi DW a kol. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol.* 2012 May; 119 (5), 890-901.

# Senzitívnosť a špecifickosť

NIPT testy majú vo všeobecnosti vysokú senzitivnosť a špecifickosť. Vyšetrenia fetálnej DNA sa medzi laboratóriami líšia v technických detailoch, s čím súvisia aj rozdiely v rozhodujúcich parametroch NIPT testov.

**Senzitivnosť** vyšetrenia vyjadruje to, koľko percent pacientov, ktorí v skutočnosti majú konkrétne ochorenie, má aj patologický výsledok vyšetrenia. Ideálna senzitivnosť je 100 %, teda všetci pacienti, ktorí majú dané ochorenie, budú mať príslušný parameter patologický. Ak je senzitivnosť testu menšia ako 100 %, napr. 99 %, znamená to, že u 99 % pacientov sa vyšetrením ochorenie aj skutočne zachytilo, zároveň to znamená, že u 1 % prípadov bol výsledok testu falošne negatívny.

**Špecifickosť**, naopak, hovorí o tom, koľko percent pacientov, ktorí nemajú dané ochorenie, nebude mať test pozitívny. Ideálom je opäť 100 %, teda žiadny pacient, ktorý nemá konkrétne ochorenie, nebude mať test pozitívny pri splnení všetkých predanalytických kritérií. Ak je špecifickosť menšia ako 100 %, napr. 99 %, znamená to, že u 1 % pacientov bol výsledok testu falošne pozitívny.

**Presnosť** vyjadruje to, u koľkých percent pacientov celkovo výsledok testu zodpovedá realite (čiže je pozitívny, ak má pacient dané ochorenie, a je negatívny, ak ho nemá). Presnosť závisí od senzitivnosti a špecifickosti testu a taktiež od výskytu danej choroby v populácii.

**Negatívna prediktívna hodnota (NPH)** vyšetrenia vyjadruje to, koľko percent pacientov, ktorí majú výsledok vyšetrenia s nízkym rizikom, aj reálne nemá dané ochorenie. Závisí od senzitivnosti, špecifickosti a výskytu ochorenia v populácii. Hodnoty senzitivnosti, špecifickosti, teda aj presnosti a negatívnej prediktívnej hodnoty, sa môžu meniť podľa konkrétneho laboratória a typu testu. Priemerné hodnoty uvedených parametrov boli publikované v rozsiahlej metaanalýze a sú uvedené v tabuľke NIPT – detekcia chromozómových aberácií.\*

## NIPT – detekcia chromozómových aberácií\*

TRIZÓMIA	VÝSKYT	SENZITÍVNOSŤ	ŠPECIFICKOSŤ	PRESNOSŤ	NPH
T21	1: 800	99,2 %	99,91 %	99,91 %	> 99,99 %
T18	1: 5000	96,3 %	99,87 %	99,87 %	> 99,99 %
T13	1: 16000	91,0 %	99,87 %	99,87 %	> 99,99 %

## TRISOMY test – výsledky pilotnej retrospektívnej validačnej štúdie

n = 203	SENZITÍVNOSŤ	95 % CI	ŠPECIFICKOSŤ	95 % CI	nP
T21	> 99 %	90,97 – 100 %	> 99 %	97,78 – 100 %	39
T18	> 99 %	x	> 99 %	x	5
T13	> 99 %	x	> 99 %	x	2

Počet vzoriek bez výsledku < 1%.

## TRISOMY test – vyhodnotenie rozsiahlej prospektívnej validačnej štúdie

n = 2863	SENZITÍVNOSŤ	95 % CI	ŠPECIFICKOSŤ	95 % CI	nP
T21	97,56 %	87,14 – 99,94 %	99,96 %	99,80 – 100 %	41
T18	91,67 %	61,52 – 99,79 %	100 %	99,87 – 100 %	11
T13	100 %	47,82 – 100 %	99,97 %	99,81 – 100 %	5

Počet vzoriek bez výsledku < 1%.

**n** – celkový počet vzoriek vo validačnej štúdii

**nP** – počet pozitívnych vzoriek

**CI** – konfidenčný interval

**x** – pre nízky počet vzoriek nevhodnotený

\* Gil MM a kol. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017 Sep;50(3):302-314.

# Mikrodelečné syndrómy

Vzhľadom na biologické a technické limitácie je presnosť vyšetrenia na mikrodelečné syndrómy v porovnaní s trizómiami 21, 18, 13 nižšia. Pre nízky výskyt mikrodelečných syndrómov v populácii nie sú dostupné validačné štúdie, ktoré by spoľahlivo overili presnosť testu na tieto syndrómy.

NÁZOV SYNDRÓMU	LOKALIZÁCIA	INCIDENCIA
DiGeorgeov syndróm	22q11	1 : 4 000
Syndróm delécie 1p36	1p36	1 : 5 000 – 10 000
Praderov-Williho a Angelmanov syndróm	15q11	1 : 10 000 – 30 000
Cri-du-chat syndróm	5p15	1 : 20 000 – 50 000
Wolfvov-Hirschhornov syndróm	4p16	1 : 50 000

Senzitívnosť pri detekcii mikrodelecií významne ovplyvňuje rozsah delécie, ktorý je pri jednotlivých syndrómoch rôzny, napr. delécia pri DiGeorgeovom syndróme má zvyčajne veľkosť okolo 3 Mbp (vyjadrené v megabázach nukleotidových párov, 1 Mbp = milión bázových párov), kým napr. pri Cri-du-chat syndróme sa bežne vyskytujú delécie s veľkosťou nad 10 Mbp. Podľa počítačovej simulácie na virtuálnych vzorkách, vytvorených podľa patogénnych mikrodelecií z databázy ISCA\*, sú pri fetálnej frakcii 15 % (fetálna frakcia je podiel voľnej DNA plodu z celkovej voľnej DNA izolovanej z krvnej plazmy tehotnej) a 10 miliónoch čítaní na analyzovanú vzorku hodnoty senzitivnosti približne takéto:

ROZSAH DELÉCIE (V MBP)	SENZITÍVNOSŤ
0 – 1	6,0 %
1 – 2	58,9 %
2 – 3	80,6 %
3 – 4	93,3 %
4 – 40	99,8 %

TRISOMY test + používa 20 miliónov čítaní na vzorku, preto sa dá predpokladať, že výsledná senzitivnosť bude o niečo vyššia. Hodnoty senzitivnosti uvedené v tabuľke platia v prípade, že je mikrodelecia prítomná aj v placente. Incidencia fetoplacentárneho mozaicizmu (odlišná genetická charakteristika plodu a placenty) nie je v prípade mikrodelecií známa.

## Unikátna metodika prípravy vzorky krvi

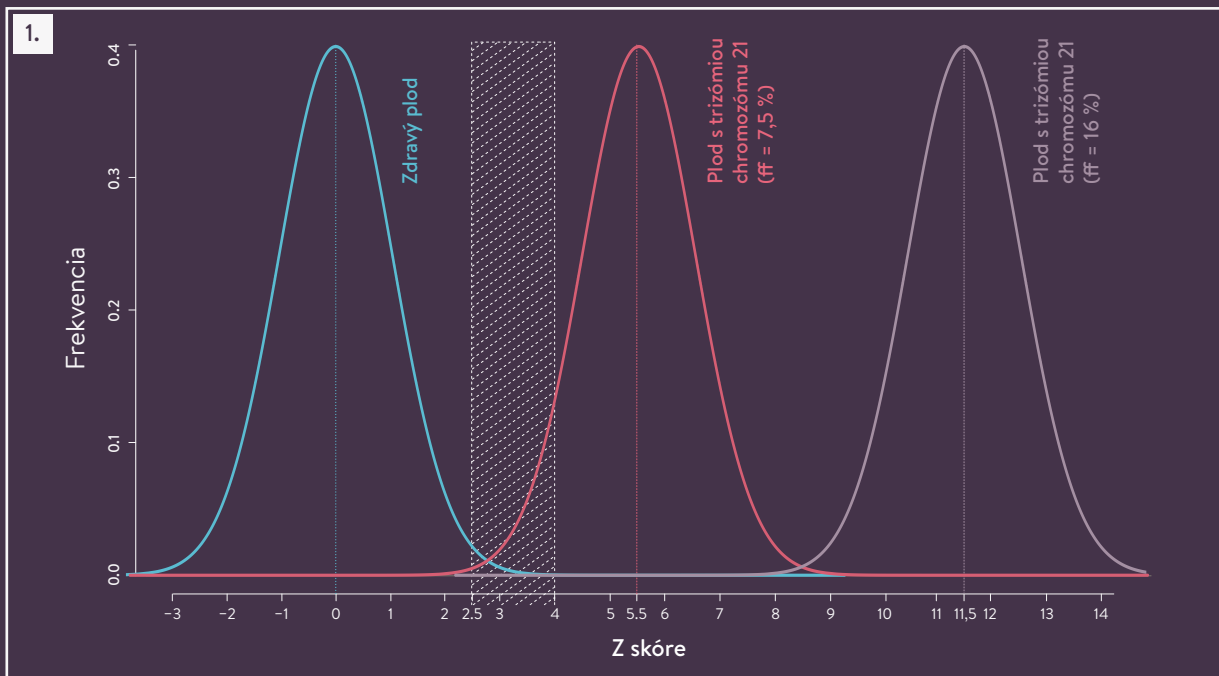
Súčasťou laboratórneho postupu **pri vyšetrení TRISOMY test je procedúra, ktorá zabezpečuje zvýšenie podielu fetálnej DNA** oproti východiskovému stavu. Je to vďaka využitiu fyzikálnej odlišnosti fetálnej DNA a DNA pochádzajúcej od tehotnej. Vďaka tomuto kroku laboratórium dosahuje po spracovaní vzoriek TRISOMY testu vyšší priemerný podiel fetálnej DNA, ako je priemerný podiel fetálnej DNA v natívných vzorkách. Výsledkom procedúry je teda možnosť analyzovať vzorky, ktoré majú v skutočnosti nižšiu fetálnu frakciu pred aplikovaním tejto procedúry, čoho výsledkom je veľmi nízky podiel neinformatívnych výsledkov, menej ako 1 %.

Na základe charakteristiky metódy prípravy, analýzy a hodnotenia vzoriek od tehotných so zdravým plodom a tehotných s plodom s trizómiou chromozómu 21, použitej v rámci našej pilotnej retrospektívnej validačnej štúdie, je možné štatisticky odhadnúť výskyt falošne pozitívnych a falošne negatívnych výsledkov v závislosti od podielu fetálnej DNA v krvi tehotnej. V nadväznosti na dostupné informácie je známe, že výška podielu fetálnej DNA v krvi tehotnej je individuálna a výskyt vzoriek s nízkou fetálnou frakciou (< 4 %) bol zistený u menej ako 5 % tehotných (priemerný podiel fetálnej DNA sa pohybuje na úrovni 14,5 %\*\*).

\* <http://dbsearch.clinicalgenome.org/search/>

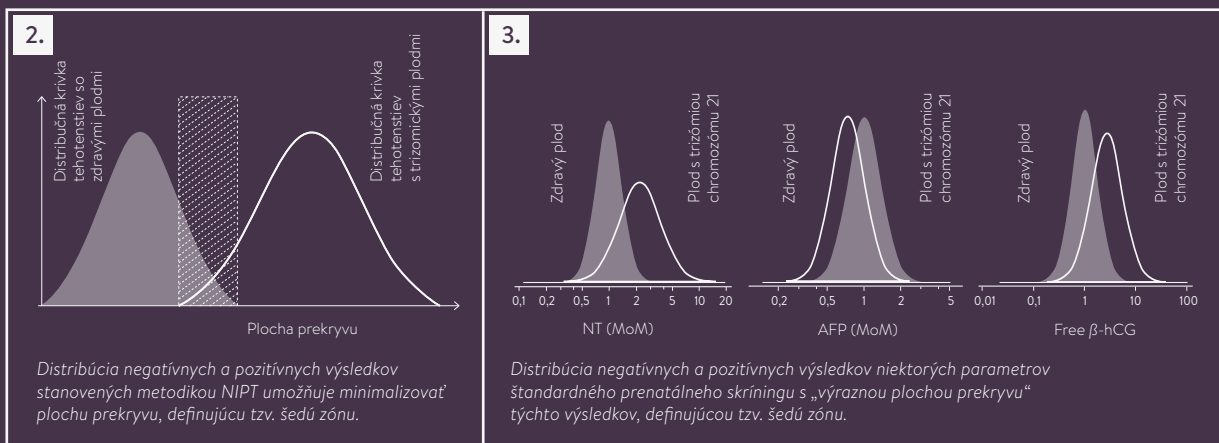
\*\* Hudecova I a kol. Maternal plasma fetal DNA fractions in pregnancies with low and high risks for fetal chromosomal aneuploidies. PLoS One. 2014 Feb 28;9(2):e88484.

## TRISOMY test



## NIPT

## Štandardný prenatalný skrining



Z výsledkov nami realizovanej pilotnej retrospektívnej validačnej štúdie, pri ktorej bolo analyzovaných 157 vzoriek od tehotných s euploidným plodom, 39 vzoriek od tehotných s plodom s potvrdenou trizómiou chromozómu 21, 5 vzoriek od tehotných s potvrdenou trizómiou chromozómu 18 a 2 vzorky s potvrdenou trizómiou chromozómu 13, vyplynulo, že priemerný podiel fetálnej DNA vo vzorkách, získaných od tehotných s plodom s trizómiou chromozómu 21, dosahoval 16 % (fialová krivka na grafe 1). Pri takomto podiele fetálnej DNA v maternálnej cirkulácii je pravdepodobnosť, že výsledok analýzy bude neinformatívny,  $\sim 1 : 720$ . Pri vzorke s najnižším v tejto validačnej štúdii pozorovaným podielom fetálnej DNA, dosahujúcim 7,5 % (červená krivka), je pravdepodobnosť výskytu neinformatívneho výsledku  $\sim 1 : 7,5$ . Ak je výsledok negatívny, pravdepodobnosť trizómie 21 je menšia ako  $1 : 100\,000$  bez ohľadu na zistenú fetálnu frakciu. Príčinou, prečo tu fetálna frakcia nemá až taký významný vplyv, je skutočnosť, že pri týchto hodnotách fetálnych frakcií už za väčšinu falošne negatívnych výsledkov nie je zodpovedná nízka fetálna frakcia, ale fetoplacentárny mozaicizmus\*, ktorý s fetálnou frakciou nesúvisí. Senzitivnosť ovplyvňuje fetálna frakcia významne iba vtedy, keď sa pohybuje v nižších číslach (väčšina takých prípadov je zaradená medzi neinformatívne), aj preto je rozdiel v senzitivnosti pri rôznych hodnotách fetálnej frakcie.

Z analýzy výsledkov vzoriek od tehotných so zdravým plodom (modrá krivka) vyplýva, že pri fetálnej frakcii 16 % je pravdepodobnosť výskytu neinformatívneho výsledku  $\sim 1 : 130$ . Pri fetálnej frakcii 7,5 % je pravdepodobnosť výskytu neinformatívneho výsledku  $\sim 1 : 7,2$ . Pravdepodobnosť výskytu falošne pozitívneho (teda nesprávneho) výsledku, ak je informatívny, je bez ohľadu na fetálnu frakciu  $\sim 1 : 4\,500$ . Pravdepodobnosť informatívneho či neinformatívneho výsledku ovplyvňuje fetálna frakcia do značnej miery, a to bez ohľadu na to, či ide o vzorku s trizómiou 21, alebo bez nej. Pri nižšej fetálnej frakcii je totiž vyššia pravdepodobnosť, že ju metóda na určovanie fetálnej frakcie zaradí medzi neinformatívne (pre nízku fetálnu frakciu).

Na minimalizáciu rizika získania falošne negatívnych, resp. falošne pozitívnych výsledkov v dôsledku priro-

dzene sa vyskytujúcich prípadov tehotenstiev s nízkou fetálnou frakciou, je pri vyhodnotení výsledkov analýz použitá zóna definujúca neinformatívne výsledky – tzv. šedá zóna. Táto je na grafe prezentovaná šrafovaným podfarbením (graf 2). Ak sa vzorka po analýze nachádza v tejto oblasti, je potrebné vzorku opätovne analyzovať. V tejto súvislosti sa vyžaduje opakovanie odberu krvi tehotnej s dvojťždňovým odstupom.

---

## Vyhodnotenie dát pomocou vlastného algoritmu

---

Dáta jednotlivých NIPT testov, získané celogenómovou sekvenačnou analýzou voľnej fetálnej DNA, sú vyhodnocované pomocou náročných matematických modelov a líšia sa v závislosti od použitej metodiky a laboratória. Cieľom hodnotenia je najčastejšie výpočet tzv. Z skóre.

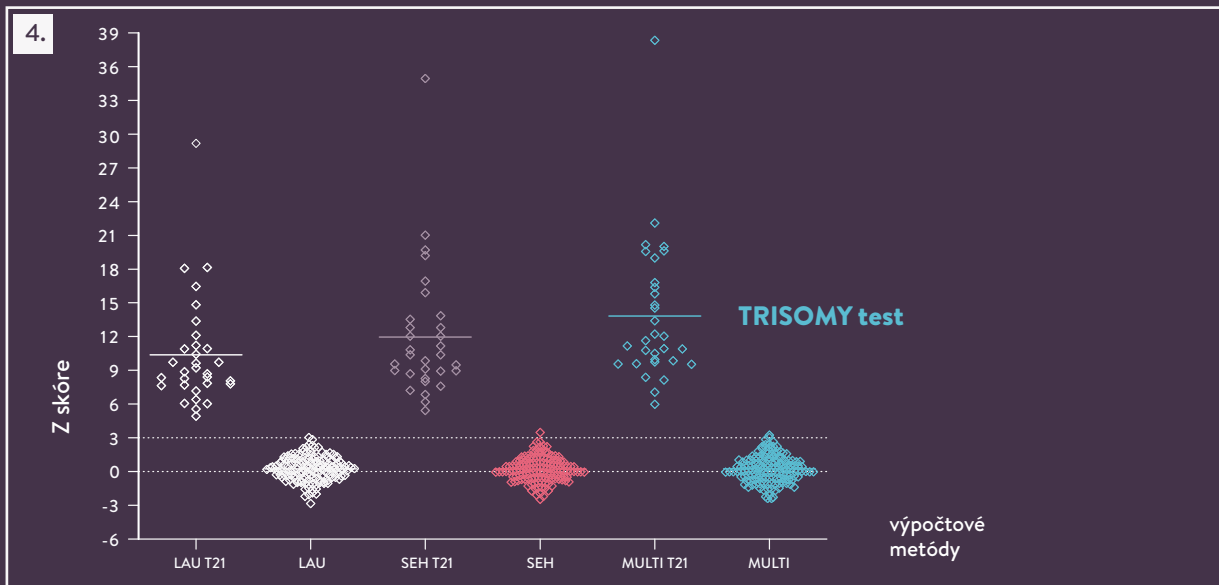
Vlastný zdokonalený algoritmus hodnotenia dát TRISOMY testu umožňuje dosiahnutie vyššej strednej hodnoty Z skóre v hodnotených vzorkách oproti publikovaným metódam výpočtu (graf 4).

Vyššia stredná hodnota Z skóre v pozitívnych vzorkách, dosahovaná zdokonaleným algoritmom pri hodnotení TRISOMY testu, sa automaticky premieta do presnejšej distribúcie negatívnych a pozitívnych výsledkov vyšetrení a umožňuje zmenšenie tzv. šedej zóny (plochy prekryvu), keď nie je možné o pozitívite či negativite výsledku vyšetrenia jednoznačne rozhodnúť.

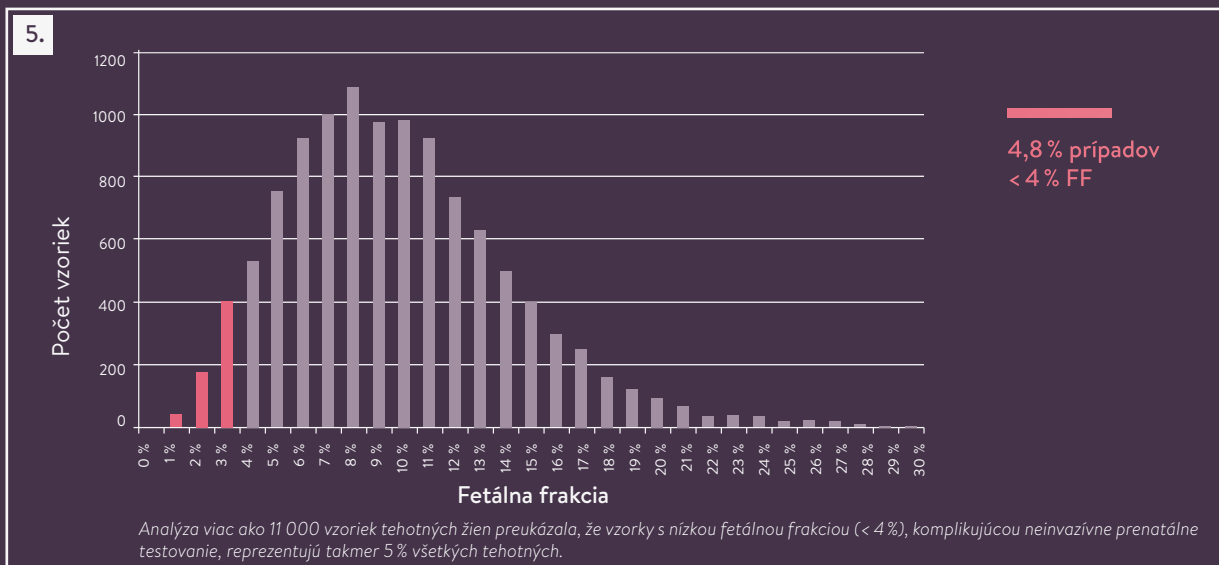
---

\* Grati FR a kol. Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results. Genet Med. 2014 Aug;16(8):620-4.

## TRISOMY test využíva zdokonalený algoritmus hodnotenia dát (MULTI)



## Volná fetální DNA – biologie



## Interferencie

---

Vzhľadom na to, že TRISOMY test, TRISOMY test XY a TRISOMY test + sú skriningové testy a nie diagnostické, môžu sa veľmi zriedkavo vyskytnúť falošne pozitívne a falošne negatívne výsledky. Výsledok vyšetrenia s vysokým rizikom je potrebné diagnosticky potvrdiť aktuálne dostupnou diagnostickou metódou, teda následným genetickým vyšetrením vzorky získanej odberom choriových klkov alebo amniocentézou.

Výsledok s nízkym rizikom nie je absolútnym vylúčením žiadnej z testovaných chromozómových aberácií. Príčinou môže byť prirodzene sa vyskytujúci fenomén mozaičizmu placenty a plodu, prípadne syndrómu miznúceho dvojčata alebo iných typov genetických, resp. epigenetických mechanizmov.

V určitom malom percente vzoriek nie je možné NIPT test ukončiť jednoznačným výsledkom, teda takýto test považujeme za neúspešný. Príčina zlyhania môže byť technická alebo biologická. Hlavnou technickou príčinou zlyhania testu býva nesprávne vykonaný odber krvi alebo transport vzorky do laboratória v nevhodujúcich podmienkach.

Najčastejším biologickým dôvodom neúspešnosti testu je predovšetkým nízky podiel fetálnej DNA v získanej vzorke v porovnaní s podielom materskej DNA. V prípade, že je podiel fetálnej DNA v získaných vzorkách nižší ako 4 %, výrazne klesá spoľahlivosť testu (graf 5). Podľa výsledkov publikovaných štúdií je možné očakávať výskyt vzoriek s nízkym podielom fetálnej DNA frakcie na úrovni 1,5 – 6,1 %.

## Limitácie testu

---

TRISOMY test, TRISOMY test XY a TRISOMY test + sú určené špecificky na zistenie vybraných chromozómových porúch. Cielene nehladané zmeny genetickej informácie sa uvádzajú vo výsledku len v prípade, že tehotná uviedla, že si želá byť o nich informovaná. Tieto doplnkové zistenia si vyžadujú interpretáciu v osobitnom režime.

TRISOMY test, TRISOMY test XY a TRISOMY test + nie sú určené na záchyt:

- triploidii a/alebo tetraploidii (viacnásobný počet všetkých chromozómov),
- vyvážených translokácií chromozómov (výmena úsekov genetického materiálu medzi chromozómami bez toho, že by časť genetickej informácie ubudla alebo pribudla),
- mozaicizmu (plod, resp. placenta obsahuje zároveň bunky s normálnymi a patologickými genetickými znakmi),
- chimérizmu (plod je zložený z tkanív pôvodne dvoch jedincov).

TRISOMY test, TRISOMY test XY a TRISOMY test + významne častejšie poskytnú neinformatívny výsledok v prípade, že sa tehotná lieči injekciami nízkomolekulového heparínu (Low Molecular Weight Heparin, LMWH). V takých prípadoch sa odporúča vykonať odber krvi tesne pred plánovaným podaním ďalšej dávky LMWH.\* Neinformatívne výsledky sa vyskytujú častejšie aj v skupine tehotných s vysokou váhou (>90 kg).\*\*

---

\* Grömminger S a kol. The influence of low molecular weight heparin medication on plasma DNA in pregnant women. *Prenat Diagn.* 2015 Nov;35(11):1155-7.

\*\* Wang E a kol. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2013 Jul;33(7):662-6.



## Odborná garancia

---

### **MUDr. Peter Križan, CSc.** odborný garant lekárskej genetiky, Medirex

---

Štúdium na Lekárskej fakulte Univerzity Komenského v Bratislave ukončil v roku 1976. O osem rokov neskôr sa štúdiom na (terajšej) Slovenskej zdravotníckej univerzite v Bratislave (SZU) špecializoval v lekárskej genetike.

V roku 1987 ukončil vedeckú aspirantúru v onkologickej genetike a získal titul kandidát vied (CSc.). Od roku 1985 do roku 1990 pôsobil ako odborný lekár na oddelení genetiky Fakultnej nemocnice v Bratislave. V roku 1990 založil genetické oddelenie na Národnom onkologickom ústave a do roku 1997 bol jeho primárom. Od roku 1990 bol 12 rokov predsedom Slovenskej spoločnosti lekárskej genetiky. Osem rokov (2005 – 2013) zastával funkciu predsedu Etickej komisie Ministerstva zdravotníctva SR.

V laboratóriách Medirex vybudoval v roku 2006 oddelenie genetiky a doposiaľ je odborným garantom tohto medicínskeho odboru. Úzko spolupracuje s 50 kolegami v Bratislave a v Košiciach. V roku 2015 stál pri zavedení TRISOMY testu do klinickej praxe na Slovensku. Doposiaľ už poskytol stovky odborných konzultácií pri výsledkoch tohto neinvazívneho prenatálneho testovania a naďalej pomáha pri zdokonaľovaní TRISOMY testu a pri jeho rozvoji.



## Autori metodiky

---

### **RNDr. Gabriel Minárik, PhD.**

manažér rozvoja lekárskej genetiky,  
Medirex

---

Absolvoval štúdium molekulárnej biológie na Katedre molekulárnej biológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave v roku 2000, kde ukončil aj doktorandské štúdium v roku 2005. Je autorom alebo spoluautorom 75 publikácií indexovaných v databáze Current Contents, ktoré sú citované 343-krát. Hirchov index má 11.

Od roku 2001 do roku 2007 pôsobil ako špecialista zabezpečujúci servisné Sanger sekvenovanie pre popredné slovenské pracovné skupiny a laboratóriá v rámci programu BITCET, pričom na Slovensku patril medzi prvých a dnes patrí medzi najskúsenejších slovenských odborníkov na túto metódu.

V súčasnosti sa venuje najmä výskumu v oblasti analýzy zmesných DNA/RNA vzoriek s aplikáciou v neinvazívnej prenatálnej a nádorovej DNA diagnostike, forenznej praxi a analýze ľudského mikrobiómu. Zároveň sa venuje zavedeniu a využitiu nových metód sekvenovania DNA v základnom a aplikovanom výskume v rámci rôznych vedeckovýskumných projektov.



## **RNDr. Tomáš Szemes, PhD.**

riaditeľ pre výskum a vývoj,  
Geneton

---

Dosahoval vynikajúce výsledky už počas štúdia na magisterskom stupni. Za diplomovú prácu sa mu podarilo získať cenu rektora Univerzity Komenského. Štúdium PhD. ukončil v roku 2010. K záveru roka 2017 je autorom alebo spoluautorom 40 publikácií indexovaných v databáze Scopus, ktoré sú citované 257-krát. Hirchov index má 10.

Vedie laboratórium genomiky a bioinformatiky vo Vedeckom parku Univerzity Komenského v Bratislave. Pôsobí aj ako riaditeľ pre výskum a vývoj v spoločnosti Geneton. Okrem výskumu laboratórium poskytuje servisné sekvenačné analýzy s použitím 1. generácie automatizovaných sekvenátorov. Podieľal sa na vytvorení genomickej podjednotky v projekte BITCET. Venuje sa aj pedagogickej činnosti predmetov počítače v biológii, bioinformatika, pokročilé metódy v molekulárnej biológii a iných.

Má dlhodobé skúsenosti s problematikou DNA. Venuje sa výskumu, ktorý využíva nové metódy sekvenovania DNA, neinvazívnej prenatálnej diagnostike, genomickému výskumu vírusov či DNA analýze vína.





[www.trisomytest.sk](http://www.trisomytest.sk)

Pre ďalšie informácie alebo pomoc volajte na bezplatné **CALL CENTRUM 0800 00 30 30**  
(pondelok – piatok: 7.00 – 16.30 h).